

**ÜBER DIE MIKRO-ANALYSE VON
UNGESÄTTIGTEN FETTSÄUREN IN MARINEN
ROT-, BRAUN- UND GRÜN-ALGEN**

PETER POHL

1965



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555206_0048

Dissertationsdruck Franz Frank, München 23,
Werneckstraße 27, Tel. 34 36 51

ÜBER DIE MIKRO-ANALYSE VON UNGESÄTTIGTEN FETTSÄUREN
IN MARINEN ROT-, BRAUN- UND GRÜN-ALGEN

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Ludwig-Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt
von
Peter Pohl
aus
Hesepe

Mai 1965



1. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Wagner
2. Berichterstatter: Prof. Dr. L. Hörhammer

Tag der mündlichen Prüfung: 23. 6. 1965

Meinen lieben Eltern in Dankbarkeit gewidmet.

Mein herzlicher Dank gilt der Stiftung Volkswagenwerk für die Erteilung eines Doktoranden-Stipendiums und dem Bayerischen Staatsministerium für Unterricht und Kultus für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes an der Zoologischen Station von Neapel.

Besonders danke ich Herrn Dr. P. Dohrn, dem Direktor der Zoologischen Station von Neapel, für die großzügige Unterstützung dieser Arbeit und Herrn Dr. K. Beth, dem Leiter der botanischen Abteilung an dieser Station, für die Bestimmung der von uns in Neapel untersuchten Meeresalgen.

Der Meeresbiologischen Station Vina del Mar der Universität von Santiago de Chile bin ich für die Übersendung von Meeresalgen verbunden.

Wertvolle Diskussionen verdanke ich Herrn Dr. E. Beck, München, Mr. James B. Courtright, Baltimore und Frau Dr. Di Costanzo, Université de Dijon.

INHALTSÜBERSICHT

	Seite
EINLEITUNG	1
ALLGEMEINER TEIL	
A) Bisher benutzte Methoden zur Isolierung und Bestimmung von ungesättigten Fettsäuren bzw. ihren Methylestern	2
1. Kristallisation	2
2. Gegenstrom-Verteilung	2
3. Hochvakuum-Destillation	3
4. Chromatographische Methoden	3
a) Säulenchromatographie	3
b) Papierchromatographie	4
c) Dünnschichtchromatographie	5
d) Gas-Chromatographie	5
5. Trennung von Fettsäure-Derivaten	6
a) Einschlußverbindungen	6
b) Silber-Doppelbindungskomplexe	7
c) Quecksilber-II-Azetat-Addukte	7
6. Zusammenfassende Übersicht über die bisher erreichten Fettsäure-Trennungen	8
B) Bisherige Untersuchungen von Algen auf ihre Fettsäure-Zusammensetzung	9
C) Entwicklung einer geeigneten Mikromethode zur Isolierung und Bestimmung von ungesättigten Fettsäuren	10
1. Extraktion von Schweinehirn und Isolierung der ungesättigten Methylester	11
2. Darstellung und Trennung der Quecksilber-Addukte	13
3. Identifizierung der aufgetrennten Quecksilber-Addukte	17

	Seite
D) Untersuchung von 16 Meeres-Algen auf die Zusammensetzung ihrer ungesättigten Fettsäuren	22 22
E) Analysenresultate bei den einzelnen Meeres-Algen	29
F) Ergebnisse und Diskussion	71
1. Vergleich der drei Algenstämme	71
2. Mögliche taxonomische Bedeutung der von uns untersuchten ungesättigten Fettsäuren	74
3. Bedeutung der untersuchten Algen als eventuelle Fettquelle	76
EXPERIMENTELLER TEIL	77
A) Untersuchung der ungesättigten Fettsäuren von Schweinehirn	77
1. Isolierung der Gesamtfettsäuren	77
2. Dünnschichtchromatographie der ungesättigten Fettsäuren	77
a) Herstellung der paraffin-imprägnierten Kieselgur-Platten	77
b) Trennsystem und Laufzeit	77
c) Sichtbarmachen der chromatographierten ungesättigten Fettsäuren	78
3. Methylierung der Gesamtfettsäuren	78
4. Wägung der Gesamt-Ester	79
5. Abtrennung der gesättigten Ester	80
6. Gewichtsbestimmung der gesättigten und der ungesättigten Ester	80
7. Dünnschichtchromatographie der ungesättigten Ester und der regenerierten Einzel-Ester	80
a) Dünnschichtplatten	80
b) Trennsystem und Laufzeit	80
c) Sichtbarmachen der ungesättigten Ester	81
8. Bildung der Quecksilber-II-Azetat-Addukte	81

	Seite
9. Dünnschichtchromatographie der Quecksilber-II-Azetat-Addukte	81
a) Dünnschichtplatten	81
b) Trennsystem und Laufzeit	82
c) Auftragen der Addukte auf die Platte	82
d) Auftragsmenge	82
e) Sichtbarmachen der chromatographierten Addukte	83
10. Identifizierung der aufgetrennten Einzeladdukte	83
a) Vergleich mit Testsubstanzen	83
b) Regenerieren der ungesättigten Einzelester aus den aufgetrennten Addukten	83
c) Alkaliisomerisation	84
d) Erneute Dünnschichtchromatographie der regenerierten Einzel-Ester	87
e) Gas-Chromatographie	87
B) Untersuchung der Meeres-Algen	87
1. Sammeln und botanische Bestimmung des Untersuchungsmaterials	87
a) Algen aus Chile	87
b) Algen aus Neapel	88
2. Extrakte	88
a) Algen aus Chile	88
b) Algen aus Neapel	88
3. Phosphor-Bestimmung	89
4. Verseifung und Abtrennung des unverseifbaren Anteils	89
5. Isolierung der Gesamt-Fettsäuren und Abtrennung der Farbstoffe	89

ANHANG

Die Entwicklung der Fettsäurebildung im Verlauf der Evolution der Lebewesen	90
---	----

A) Vorkommen und Biosynthese der gesättigten Fettsäuren	93
B) Vorkommen und Bildung der ungesättigten Fettsäuren	94
1. Biosynthese der ungesättigten Fettsäuren bis zu den Bacteriophyta	94
a) Anaerober Synthese-Weg	95
b) Aerober Synthese-Weg	96
2. Entwicklung der Fettsäure-Synthese von den Bacteriophyta bis zu den Phytoflagellatae	97
3. Entwicklung der Fettsäure-Synthese von den Phytoflagellatae bis zu den Algen	100
4. Entwicklung der Fettsäure-Synthese von den Algen bis zu den Landpflanzen	102
5. Bildung der ungesättigten Fettsäuren bei Tieren	104
a) Palmitoleinsäure-Familie	105
b) Ölsäure-Familie	105
c) Linolsäure-Familie	106
d) Linolensäure-Familie	106
C) Trennung von Autotrophen und Heterotrophen	108
1. Möglichkeit der Trennung auf dem Ölsäure-Niveau	108
2. Möglichkeit der Trennung auf dem Linol-Linolensäure-Niveau	109
LITERATURVERZEICHNIS	113

EINLEITUNG

Jahrhundertlang bildeten die Landpflanzen das alleinige Reservoir für die menschliche Ernährung und medizinische Nutzung. Nachdem vor etwa 20 Jahren die Pilze und Bakterien als Lieferanten wichtiger Antibiotica erkannt worden waren, wandte sich die Aufmerksamkeit in zunehmendem Masse auch den Meerespflanzen zu. Das Interesse stieg noch, seit man feststellte, daß die Meerespflanzen und unter ihnen vor allem die Algen einen hohen Gehalt an Lipoiden, Kohlenhydraten, Eiweiß u. a. m. besitzen. Von Bedeutung dürfte dabei auch die Annahme sein, daß die Gesamtmenge der Meerespflanzen etwa der aller Landpflanzen entsprechen soll.

Während von den Inhaltsstoffen der Meerespflanzen die Polysaccharide schon vor einiger Zeit in Form der bekannten Alginat in die Pharmazeutische und Lebensmittel-Industrie Eingang fanden, schenkte man den Lipoiden bzw. den Fetten und Fettsäuren bisher nur wenig Beachtung. Dies ist um so erstaunlicher, als es für das Vorhandensein dieser Fettquelle einen guten indirekten Hinweis gibt, nämlich den Fischreichtum der Meere und die aus den Fischen gewonnenen Öle. Wie wir wissen, besteht die Hauptnahrung der Fische aus Plankton und Algen.

Erste orientierende Untersuchungen (1 - 12) der letzten Jahre haben gezeigt, daß die Algen über einen beträchtlichen Gehalt an ungesättigten Fettsäuren verfügen, der unter geeigneten Bedingungen durch Züchtung noch stark erhöht werden kann. Darüberhinaus besitzen viele Algenauszüge eine deutliche antibakterielle Wirkung, die mit diesen Lipoidbestandteilen in Zusammenhang gebracht wird (13, 14).

Hauptziel der vorliegenden Arbeit sollte sein, eine auch präparativ verwendbare Mikromethode für die Analyse von ungesättigten Fettsäuren zu entwickeln, mit deren Hilfe eingehende Untersuchungen an einer größeren Anzahl von marinen Rot-, Braun- und Grün-Algen durchgeführt werden konnten. Darüberhinaus war zu prüfen, welche Algen als eventuelle Fettlieferanten auch für Massenkulturen in Frage kommen. Schließlich sollte versucht werden, anhand der festgestellten Fettsäuren und durch Vergleich mit den angrenzenden Pflanzengruppen (Flagellaten, Landpflanzen) einen Beitrag zur Diskussion der Pflanzen-Evolution zu liefern.

A) BISHER BENUTZTE METHODEN ZUR ISOLIERUNG UND BESTIMMUNG VON UNGESÄTTIGTEN FETTSÄUREN BZW. IHREN METHYLESTERN

1. Kristallisation:

Die Löslichkeit von Fettsäuren in organischen Lösungsmitteln steigt mit zunehmender Doppelbindungsanzahl und abnehmender Kettenlänge, sodaß sich Fettsäuregemische durch Behandlung mit verschiedenen Lösungsmitteln grob fraktionieren lassen.

So gelang es HOERR und HARWOOD (15), Ölsäure und Linolsäure aus Hexan, Cyclohexan, Chloroform, Tetrachlorkohlenstoff, Benzol, Aceton u. a. sowie Linolensäure aus Methanol abzuscheiden. BROWN und KOLB (16, 17) kristallisierten höhere Monoenfettsäuren und Linolsäure auch aus Dimethylbutan, Heptan und Äthylazetat. STOFFEL und AHRENS (18) führten eine mehrfache Fraktionierung eines Fettsäuregemisches aus Aceton bei -20° , -40° und -70° C durch und erreichten damit eine Auftrennung in gesättigte und mono- ungesättigte sowie in poly-ungesättigte Fettsäuren. Über weitere Arbeiten mit dieser Methode gibt SCHLENK (19) eine Übersicht.

Für die Praxis ist nur die fraktionierte Kristallisation der freien Fettsäuren und Ester in gesättigte und wenig ungesättigte sowie hochungesättigte brauchbar. Sie wird heute dann angewendet, wenn aus einem komplex zusammengesetzten Fettsäuregemisch der Hauptteil der gesättigten Verbindungen abgetrennt werden soll.

2. Gegenstrom - Verteilung

Nachdem es AHRENS und CRAIG (20) im Jahre 1952 erstmals gelungen war, die gesättigten Fettsäuren von C_{12} bis C_{18} sowie die ungesättigten Fettsäuren $C_{18}(1=)$, $C_{18}(2=)$ und $C_{18}(3=)$ ^{x)} mit verschiedenen Trennsystemen (Heptan, Eisessig, Formamid und Methanol) durch 400 - 500 Verteilungsschritte zu trennen, wurde dieses Verfahren von zahlreichen anderen Autoren weiterentwickelt. Besonders müssen die Arbeiten von KLENZ (21 - 28), SCHOLFIELD (29) und WILL (30) erwähnt werden. Nach CANNON (31) waren für eine 84%-ige Auftrennung von einigen Modellmischungen im System Pentan/Hexan - Nitroparaffin (Nitromethan-Nitroäthan 1:4) folgende Verteilungsschritte notwendig:

Öl- und Stearinsäure:	mehr als 10.000 V. S.
Linol- und Linolensäure:	300 V. S.
Öl- und Linolensäure:	55 V. S.
Linolen- und Palmitinsäure:	48 V. S.
Linolen- und Stearinsäure:	32 V. S.

^{x)} Zur Schreibweise:

Alle hier besprochenen Fettsäuren sind geradkettig. Die Indexzahl hinter dem C gibt die Zahl der C-Atome, die Zahl in der Klammer die Zahl der Doppelbindungen an. Die Doppelbindungen sind isoliert und besitzen durchwegs cis-Konfiguration.

Der Nachteil der Gegenstrom-Verteilung ist, daß man 1.) die zu trennenden Fettsäuremischungen vorfraktionieren muß, 2.) nur relativ geringe Mengen an reiner Substanz erhält und 3.) abgesehen vom zeitlichen Aufwand sehr große Lösungsmittelmengen benötigt. Deshalb hat sich diese Methode bei der Analyse von Fettsäuregemischen bisher nur wenig durchzusetzen vermocht.

3. Hochvakuum-Destillation

Diese Methode wurde besonders von KLENK (23, 24, 26, 27, 28, 32, 33, 34) und JANTZEN (35) zur Fettsäureanalyse von Organ- und Fischlipoiden mit großem Erfolg angewendet. Mit Hilfe der Hochvakuumdestillation gelingt es, die ungesättigten Ester nach ihrer Kettenlänge weitgehend zu trennen. Man erhält Gemische von Fettsäure-Estern mit vorwiegend einheitlicher Kettenlänge. Da sich diese Ester aber noch in der Zahl der Doppelbindungen voneinander unterscheiden, müssen weitere Trennverfahren angeschlossen werden.

Der Anwendungsbereich der Hochvakuumdestillation wird dadurch sehr eingeschränkt, daß hohe Ausgangsmengen an Fettsäuren bzw. Estern erforderlich sind. So arbeitete z. B. SCHLENK (9) mit mehreren Portionen von je 30 g ungesättigter Ester, STOFFEL (18) destillierte 100 g und TOYAMA (37) verwendete als Ausgangsmaterial nicht weniger als 8,8 kg Polyensäurekonzentrat.

Besonders ungünstig für exakte Analysen erweisen sich die bei der Hochvakuumdestillation angewendeten hohen Temperaturen (Heizbad z. T. über 230°C), wodurch es nicht selten zu Veränderungen der ungesättigten Fettsäuren und Ester (38) kommt.

PRIVETT (39) wies kürzlich auf die Bildung von Artefakten vor allem bei der Hochvakuumdestillation von hochungesättigten C₂₀- und C₂₂- Estern hin.

4. Chromatographische Methoden

a) Säulenchromatographie

In einer ersten Arbeit gelang es HOWARD und MARTIN (40) im Jahre 1950, mit Hilfe von silaniertem und paraffin-imprägniertem Kieselgel ("Umkehrphasenchromatographie") die gesättigten C₁₂-, C₁₄-, C₁₆- und C₁₈-Fettsäuren zu trennen. Die ungesättigten Fettsäuren wurden nicht befriedigend getrennt. Später erreichte CROMBIE (41) die Trennung der

C₁₈(1=)-, C₁₈(2=)- und C₁₈(3=)-Fettsäuren, jedoch nur in Abwesenheit von Myristinsäure und anderen gesättigten Fettsäuren. KAPITEL (42) trennte auf ähnliche Weise die gesättigten C₈- bis C₁₈-Fettsäuren sowie die C₁₈-, C₁₈(1=)-, C₁₈(2=)- und C₁₈(3=)-Fettsäuren. Es war aber auch ihm nicht möglich, die Fettsäure-Paare C₁₆ und C₁₈(1=) sowie C₁₂ und C₁₈(3=) voneinander zu trennen. Die Ursache hierfür sind die bei der Anwendung der "Umkehrphasenchromatographie" in den obigen Verfahren auftretenden sogenannten "Kritischen Paare".

Bei der "Umkehrphasenchromatographie" wandern Substanzen, die sich auf unbehandeltem Material schnell bewegen würden, langsam, d. h. in umgekehrter Reihenfolge. Während man mit Hilfe von unbehandeltem Material nur sehr schlechte Fettsäuretrennungen erzielt, ergibt die Umkehrphasenchromatographie wesentlich bessere Resultate. Man muß aber den Nachteil in Kauf nehmen, daß Fettsäuren, die sich durch eine Doppelbindung und zwei C-Atome voneinander unterscheiden, gleiche RF-Werte haben und als "Kritische Paare" ungetrennt bleiben, wie dies z. B. bei den Paaren C₁₆- und C₁₈(1=) oder C₁₈(1=) und C₂₀(2=) der Fall ist.

Einigen Fortschritt brachten die Arbeiten von HIRSCH (43) und FRANZKE (44), die mit Hilfe von gemahlenem Naturkautschuk bzw. mit Kieselgur die Trennung der C₁₈-, C₁₈(1=)-, C₁₈(2=)- und C₁₈(3=)-Fettsäuren erreichten. PRIVETT (39) erzielte ähnliche Ergebnisse mit Hilfe einer heptangesättigten Celite-Säule, ohne daß auch hier die Trennung des Kritischen Paares C₁₆ und C₁₈(1=) möglich gewesen wäre. Völlig unzureichend erwies sich die Säulenchromatographie für die Trennung der höherungesättigten Fettsäuren mit 4, 5 und 6 Doppelbindungen.

b) Papierchromatographie

Auf diesem Gebiet sind an erster Stelle die zahlreichen Arbeiten von KAUFMANN und Mitarbeitern zu nennen (45 - 51).

Von der Vielzahl weiterer Veröffentlichungen haben besonders die von BALANCE (52), MANGOLD (53, 54), SCHLENK (9), SEHER (55), SKIPSKI (56), TOYAMA (57), WAGNER (58) und WEGMANN (59) Bedeutung erlangt. Alle genannten Verfahren arbeiten nach dem bereits erwähnten Prinzip der Umkehrphasenchromatographie, wobei das Papier vor der Chromatographie mit Paraffin, Silikon-Ölen, Undecan u. ä. behandelt wird. Es gelang zwar hiermit, die gesättigten C₁₀- bis C₃₂- sowie die ungesättigten C₁₈(1=), C₁₈(2=)- und C₁₈(3=)-Fettsäuren zu trennen, doch konnte auch hier das Problem der Kritischen Paare nicht gelöst werden.

Für die Analyse eines Fettsäuregemisches, in dem solche Paare zu erwarten sind, ist somit die Papierchromatographie wenig geeignet, wenngleich

es nicht an Versuchen gefehlt hat, die Kritischen Paare durch chemische Veränderungen auf dem Papier (z. B. Hydrierung, Bromierung u. a.) zu trennen oder nebeneinander zu identifizieren. Diese Bestimmungen sind zumeist recht kompliziert und werden gänzlich undurchführbar, wenn höherungesättigte Fettsäuren der C₂₀- und C₂₂- Reihe hinzukommen, weil dann ganze "Kritische Gruppen" mit gleichen RF-Werten auftreten können, wie z. B. C₁₆(1=), C₁₈(2=), C₂₀(3=) und C₂₂(4=) oder C₁₆(2=), C₁₈(3=), C₂₀(4=) und C₂₂(5=) etc.

Auch ist eine Isolierung der Einzelfettsäuren aus dem Papier wegen der angewandten Imprägnierungsmittel und Anfärbe-Reagentien praktisch unmöglich.

Eine für die Trennung der ungesättigten Fettsäuren ausreichende papierchromatographische Methode ohne Imprägnierung des Papiers ist bisher nicht gefunden worden.

c) Dünnschichtchromatographie

Angeregt durch die grundlegenden Arbeiten von STAHL (60, 61) fand seit 1958 auch diese Methode in zunehmendem Maße auf dem Fettsäuregebiet Verwendung. KAUFMANN (62 - 66) sowie MALINS (67) erreichten die Trennung der gesättigten C₈- bis C₂₂- und die der ungesättigten C₁₈(1=)-, C₁₈(2=)- und C₁₈(3=)-Fettsäuren. Zwei umfassende Übersichten über die bis 1961 bzw. 1964 erzielten Ergebnisse finden sich bei MANGOLD (68, 69). Die Dünnschichtchromatographie hat gegenüber der Papierchromatographie den Vorteil der Zeitersparnis (60 - 90 Minuten gegenüber 8-12 Stunden) und einer größeren Trennschärfe, doch muß man auch hier wieder nach dem Prinzip der Umkehrphasenchromatographie arbeiten, um gute Trennungen zu erreichen. Die exakte Analyse eines natürlichen Fettsäuregemisches scheitert wieder an den auftretenden Kritischen Paaren.

d) Gas-Chromatographie

Seit den ersten gaschromatographischen Trennversuchen mit Fettsäuren durch JAMES (70) und mit Fettsäure-Methylestern durch CROPPER (71) ist diese Methode durch die Entwicklung modernerer Apparate laufend verbessert und verfeinert worden. Die meisten Fettsäure-Untersuchungen werden z. Z. mit Polyester- oder Apiezon-Säulen durchgeführt. Aus der Vielzahl der gaschromatographischen Arbeiten seien hier nur die für den heutigen Entwicklungsstand charakteristischen Beispiele genannt: BLOCH (72), HERB und RIEMENSCHNEIDER (73), KORN (74), STUMPF

(75) und WAKIL (76) arbeiten mit Polyäthylenglykol-Succinat als stationärer Phase und Chromosorb W als Trägermaterial. BRADY (77) verwendet die gleiche stationäre Phase auf "firebrick", ebenso HOLMAN (78) auf Gaschrom P. JAMES (79) benutzt Polyäthylenglykol-Adipat auf Chromsorb, W, KLENZ (80) Reoplex 400 auf Celite bzw. Kieselgel und MEAD (81) 1,4-Butandiol-Succinat-Polyester auf "firebrick". Daneben wird auch Apiezon eingesetzt (82).

Als Trägergas dient in der Regel Argon. Die angewendeten Temperaturen liegen zwischen 165° und 200° C. Während die für die üblichen gaschromatographischen Untersuchungen erforderlichen Substanzmengen nur einige Milligramm betragen, lassen sich mit Hilfe der Kapillar-Gaschromatographie (83, 84, 85) sogar Untersuchungen im µg-Bereich durchführen.

Durch die mittlerweile hoch entwickelte Gaschromatographietechnik gelingt es heute, nahezu alle vorkommenden Fettsäuren voneinander zu trennen. Wegen der Vielzahl der Fettsäuren können auch hier Kritische Paare auftreten, sodaß es zu Überlappungen der "Peaks" kommt. Deshalb ist es notwendig, die Fettsäuren vorzufractionieren. Da außerdem nur geringe Mengen eingesetzt werden können, ist die Gaschromatographie für die Iso-lierung von Einzelfettsäuren wenig geeignet. Schließlich können durch die angewendeten hohen Temperaturen bei den ungesättigten Verbindungen Veränderungen auftreten. So wurden vor allem bei den Estern mit hohen Retentionszeiten, d.h. bei den langkettigen und hochungesättigten Estern, Umesterungen mit der stationären Polyesterphase (86) sowie bei konjugierten Triensäuren cis-trans-Isomerisierungen (87) beschrieben. Nach den kürzlichen Untersuchungen von GERSON (88) kommt es außerdem bei der Gaschromatographie von langkettigen und hochungesättigten Estern zu hohen Substanzverlusten, die bei den C₂₀-Ester über 50 % und bei den C₂₂-Ester bis zu 86 % betragen können.

5. Trennung von Fettsäure-Derivaten

a) Einschlußverbindungen

Fettsäuren und ihre Ester bilden mit einigen Substanzen Einschlußverbindungen, wie z. B. mit α -Dextrin, β -Dextrin und Desoxycholsäure (89) sowie mit Thioharnstoff (90). Von analytischer Bedeutung sind aber nur die Addukte von Fettsäuren bzw. Estern mit Harnstoff. Mit dieser Methode gelang die Trennung von gesättigten und ungesättigten Fettsäuren bzw. die Anreicherung von einzelnen ungesättigten Fettsäuren aus Polyenkonzentration. Zu erwähnen sind vor allem die Arbeiten von ABU-NASR (91), LEUPOLD (92, 93), MARTINEZ (94), NEWAY (95), PRIVETT (96), SCHLENK (97),

SCHOLFIELD (29), SUMERWELL (98) und SWERN (99, 100, 101).

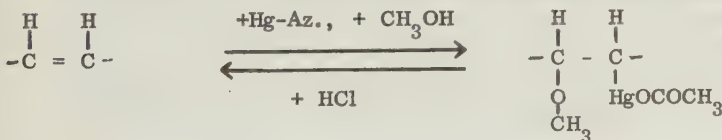
Die Trennung von Fettsäuren mit mehr als 3 Doppelbindungen allein mit der Harnstoffmethode ist bisher noch nicht gelungen.

b) Silber-Doppelbindungskomplexe

Diese in letzter Zeit häufiger angewendete Methode beruht auf der Bildung von Komplexverbindungen durch Anlagerung von Silber an Doppelbindungen, wobei die Stabilität dieser Komplexe vor allem von der geometrischen Form der Doppelbindungen abhängt (107). Nach den ersten orientierenden Untersuchungen von WINSTEIN (102) und LUCAS (103) trennte NICHOLS (104) 1952 die stereoisomeren Öl- und Elaidinsäuremethylester mit Hilfe einer Verteilung. DUTTON (105) trennte ebenso trans-trans, cis-trans und cis-cis-Linolester. Weitere Arbeiten auf diesem Gebiet erfolgten vor allem durch DE VRIES, der säulen- und dünnenschichtchromatographisch Stearin-, Öl- und Elaidinester, stereoisomere $C_{18}(2=)$ -Ester sowie Öl-, Linol- und Linolensäure-Ester trennte (106, 107, 108). Diese letzte Trennung gelang auch WURSTER (109) mit Hilfe einer Ionenaustauschersäule. MORRIS (110) trennte die C_{18} -, $C_{18}(1=)$ -, $C_{18}(2=)$ - und Elaidin-Ester, und SCHOLFIELD (111) versuchte, Monoen-, Dien- und Trienfettsäuren in ihre Isomeren zu trennen. BHATTY (112) reicherte mit Hilfe der Säulenchromatographie Monoene, Diene, Triene und Tetraene an. WAGNER (113) fraktionierte ein Fettsäuregemisch in gesättigte und ungesättigte normale Fettsäuren sowie in gesättigte und ungesättigte Hydroxyfettsäuren. Die Trennung von vierfach- und höherungesättigten Fettsäuren sowie von ungesättigten Fettsäuren unterschiedlicher Kettenlänge ist bisher noch nicht gelungen. Die obige Methode dürfte sich vor allem für die Trennung von isomeren ungesättigten Fettsäuren mit nicht zu hoher Doppelbindungszahl (1 - 3 Doppelbindungen) eignen.

c) Quecksilber-II-Azetat-Addukte

Bessere Ergebnisse erzielte man, indem man die Methyl ester in ihre Quecksilber-II-Azetat-Addukte überführte. Quecksilberazetat lagert sich in methanolischer Lösung in der folgenden Weise an Doppelbindungen an (114):



Die auf diese Weise gebildeten Addukte sind wegen der "maskierten" Doppelbindung stabil gegen Oxydation und unterscheiden sich chromatographisch wesentlich mehr voneinander als die reinen ungesättigten Fettsäuren oder ihre Methylester. Sie sind empfindlich gegen Säuren und werden durch diese wieder in die ungesättigten Ester und Quecksilbersalz gespalten. STEARNS (115) benutzte die Adduktbildung, um aus verschiedenen Ölen die ungesättigten Ester anzureichern. Zur selektiveren Auftrennung der Addukte verwendete man vor allem die Säulen-, Papier- und Dünnschichtchromatographie.

Mit Hilfe der Säulenchromatographie über Kieselgelsäulen gelang JANTZEN und ANDREAS (116) die Trennung von Monoen- und Polyen-Addukten, die der künstlichen Gemische C_{18} , $C_{18}(1=)$ und $C_{18}(2=)$ (117) sowie die Trennung von Monoen-, Dien- und Polyen-Addukten (118). Mit Hilfe einer Aluminiumoxid-Säule erreichte KUEMMEL (119) die Trennung von Monoen- und Polyenaddukten und WHITE (120) die der $C_{18}(1=)$, $C_{18}(2=)$ und $C_{18}(3=)$ -Addukte, wobei sich die beiden letzteren nicht vollständig trennen ließen. BLOCH (121) trennte im Mikromaßstab über eine Kieselgel-Säule die gesättigten Ester von den Gesamtaddukten, während KISHIMOTO (122) dazu eine Florisil-Säule benutzte.

Mit Hilfe der Papierchromatographie gelang INOUE und NODA (123 - 125) die Trennung der Addukte $C_{16}(1=)$ und $C_{18}(1=)$, die der monoungesättigten C_{10} - bis C_{18} -Addukte sowie die der $C_{18}(1=)$ -, $C_{18}(2=)$ - und $C_{18}(3=)$ -Addukte.

MANGOLD und KAMMERECK (126) versuchten 1961, die Addukte dünnschichtchromatographisch zu trennen. Allerdings gelang nur die Trennung in die Monoen-, Dien- und Polyenaddukte. Die Auftrennung von Fettsäuren mit mehr als 3 Doppelbindungen wurde bisher noch nicht beschrieben.

6. Zusammenfassende Übersicht über die bisher erreichten Fettsäure-Trennungen

Mit Hilfe der Kristallisation gelangt man zu einer Anreicherung der ungesättigten Fettsäuren bzw. ihrer Ester. Die Gegenstromverteilung liefert gute Trennergebnisse, erfordert aber großen Zeit- und Lösungsmittel-Aufwand. Außerdem müssen die zu trennenden Substanzen vorfraktioniert werden. Die Ausbeuten an reinen Substanzen sind sehr gering. Mit Hilfe der Hochvakuumdestillation erhält man gute Trennungen, doch müssen, abgesehen vom apparativen Aufwand, viel zu große Substanzmengen eingesetzt werden. Fast allen säulen-, papier- und dünnschichtchromatographischen Verfahren liegt das Prinzip der Umkehrphasenchromatographie zu Grunde.

Dadurch ergibt sich der große Nachteil, daß Kritische Paare auftreten, die nicht oder nur sehr umständlich voneinander getrennt werden können. Die Gaschromatographie gehört z. Z. zu den gebräuchlichsten und besten Methoden der Fettsäure-Analyse. Allerdings läßt sie sich nur schlecht für die Isolierung von Einzelfettsäuren verwenden. Auch können infolge der angewendeten hohen Temperaturen Veränderungen bei den ungesättigten Fettsäuren auftreten. Wegen der oftmals auftretenden Überlappungen von "Peaks" und der dadurch entstehenden Unsicherheit bei der Identifizierung der Fettsäuren muß die Gaschromatographie in den meisten Fällen mit anderen Trennverfahren kombiniert werden. Mit Hilfe der Harnstoff-Einschlußverbindungen gelingt nur die Trennung von Fettsäuren mit 1 oder 2 Doppelbindungen. Auch die in neuerer Zeit häufig benutzten Silber-Doppelbindungskomplexe ermöglichen höchstens die Fraktionierung in Monoen-, Dien- und Trien-Fettsäuren sowie in die Isomeren dieser Fettsäuren. Auch die Auftrennung über die Quecksilber-II-Addukte mit Hilfe von Säulen-, Papier- oder Dünnschichtchromatographie brachte nur bei Fettsäuren mit höchstens 2 Doppelbindungen gute Trennergebnisse.

Abgesehen von der Gaschromatographie gelang mit keinem der obigen Verfahren neben der Trennung nach der Zahl der Doppelbindungen auch noch eine Auftrennung nach den verschiedenen Kettenlängen.

Beides wäre aber für die von uns geplante Isolierung und Bestimmung von ungesättigten Fettsäuren aus Meeresalgen notwendig gewesen, da wir auf Grund von Vor-Untersuchungen wie z. B. Alkali-Isomerisation und Hydrierung eines Gemisches von ungesättigten Algenfettsäuren wußten, daß Algen ungesättigte C₁₆- bis C₂₂-Fettsäuren mit 1 - 6 Doppelbindungen enthalten können.

B. BISHERIGE UNTERSUCHUNGEN VON ALGEN AUF IHRE FETTSÄURE-ZUSAMMENSETZUNG

Die Zahl der Fettsäureuntersuchungen bei Algen ist verhältnismäßig gering. Der Grund dafür dürfte darin liegen, daß es bis etwa 1950 noch keine ausreichende Fettsäure-Analytik gab, vor allem nicht für die Untersuchung von kleineren Algenmengen. Erst nach Einführung der auf den vorangegangenen Seiten beschriebenen Methoden war man in der Lage, Algen näher auf ihre Fettsäurezusammensetzung zu untersuchen, benötigte dafür aber relativ große Mengen an fettsäurereichen Algen, die man meist durch Züchtung von einzelligen Süßwasser-Grünalgen in der erforderlichen Reinheit erhielt. So untersuchten MILNER (2), PASCHKE und WHEELER (4) sowie SCHLENK und Mitarbeiter (9) die Süßwasseralgae Chlorella unter Verwendung von Hochvakuumdestillation, Gegenstromverteilung, Papier- und Gaschromato-

graphie. Mit Hilfe einer ähnlichen Kombination ermittelte KLENK die Fettsäurezusammensetzung von Plankton (127) und die der Süßwasseralge *Scenedesmus obliquus* (128, 129). FOGG und COLLYER (5) züchteten 11 verschiedene Süßwasseralgen und erreichten eine stark vermehrte Fettbildung, führten aber keine genaueren Analysen durch. Erst 1963 erschien von KLENK (28) eine systematische Fettsäure-Untersuchung an 8 Meeresalgen mit Hilfe einer Kombination von fraktionierter Kristallisation, Säulenchromatographie der Quecksilber-Addukte, Hochvakuumdestillation, Gegenstromverteilung und Gaschromatographie. Klenk stellte in diesen Algen das Vorkommen von höherungesättigten Fettsäuren der C₁₆-, C₁₈-, C₂₀- und C₂₂-Reihen fest und bestimmte z. T. die Struktur dieser Fettsäuren.

C) ENTWICKLUNG EINER GEEIGNETEN MIKROMETHODE ZUR ISOLIERUNG UND BESTIMMUNG VON UNGESÄTTIGTEN FETTSÄUREN x)

Für die Entwicklung einer geeigneten Trennmethode im Mikromaßstab kam von vornherein nur die Dünnschichtchromatographie wegen ihres geringen zeitlichen und apparativen Aufwandes in Frage. Obwohl die Auftrennung der Quecksilber-Addukte bisher wenig befriedigende Resultate gebracht hatte, entschieden wir uns für sie, weil sich die Quecksilberaddukte wesentlich mehr voneinander unterscheiden als die freien Fettsäuren oder Ester. Außerdem sind sie relativ stabil gegen Oxidation.

Zur Ausarbeitung der neuen Mikromethode dienten die in ihrer Fettsäurezusammensetzung bekannten Lipide des Schweinehirns. Es ist bekannt, daß Hirnlipide einen beträchtlichen Anteil an hochungesättigten Fettsäuren der C₁₈-, C₂₀- und C₂₂-Reihe enthalten (21, 33). Der ausschlaggebende Grund aber war, daß Schweinehirn in größeren Mengen eine C₂₂(6=)-Fettsäure enthält. Diese Fettsäure ist die am höchsten ungesättigte Fettsäure, die bisher in der Natur gefunden wurde.

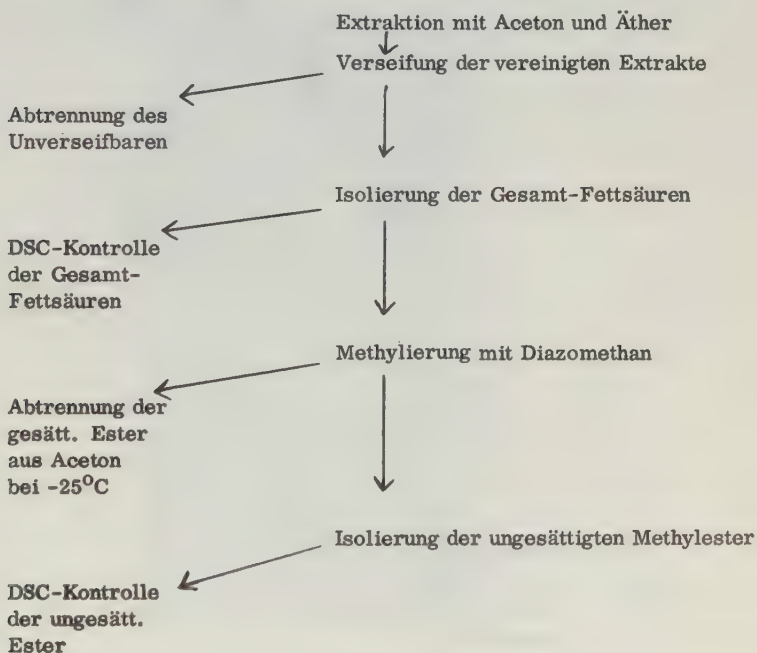
x) Folgende Abkürzungen wurden in dieser Arbeit benutzt:

- A = Aceton
- AN = Acetonitril
- AS = Ameisensäure 98-100 %
- DC = Dünnschichtchromatographie
- Ester = Methyl-Ester der ungesättigten Fettsäuren
- Hg-Add. = Quecksilber-II-Azetat-Addukte der Methyl-Ester der ungesättigten Fettsäuren
- IB = Isobutanol
- LM = Laufmittel
- W = Wasser

1. Extraktion von Schweinehirn und Gewinnung der ungesättigten Methyl-Ester

Diese erfolgt nach der in Schema 1 angegebenen Weise:

Schema 1: Darstellung der ungesättigten Methylester aus Schweinehirn



Schweinehirn wurde mit Aceton und Äther extrahiert, die vereinigten Extrakte verseift, der unverseifbare Anteil abgetrennt und nach dem Ansäuern die Gesamtfettsäuren mit Petroläther extrahiert. Diese und alle folgenden Arbeiten wurden, soweit möglich, unter Stickstoff ausgeführt.

Zur ersten Orientierung über den Gehalt an ungesättigten Fettsäuren untersuchten wir die Gesamtfettsäuren dünnenschichtchromatographisch in dem speziell hierfür von uns entwickelten Laufmittel Ameisensäure/Acetonitril (3:1). Die Trennung erfolgt auf paraffin-imprägnierten Kieselgur-Platten, das Sichtbarmachen der aufgetrennten Fettsäuren mit OsO_4 -Dampf.

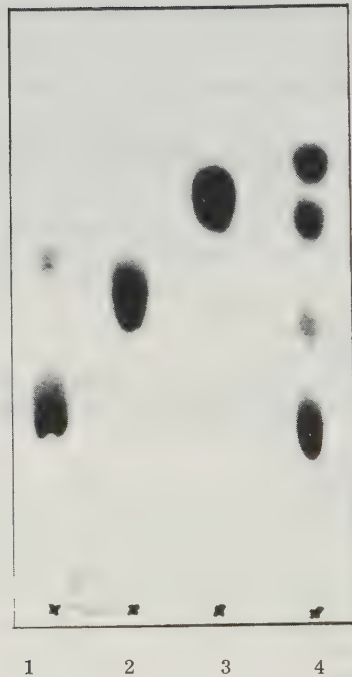


Abb. 1

DC der Gesamtfettsäuren von Schweinehirn

LM: AS / AN (3:1)

1: Ölsäure

2: Linolsäure

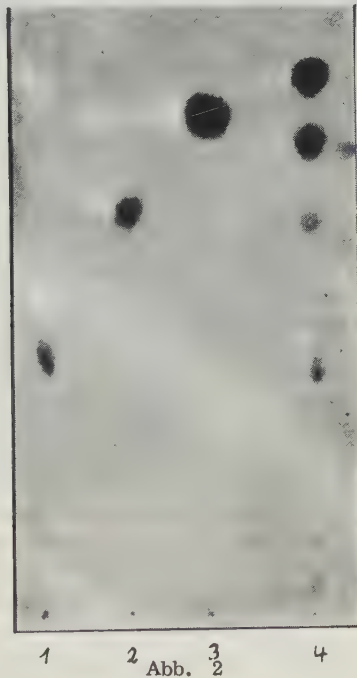
3: Linolensäure

4: Gesamt-Fettsäuren von Schweinehirn

Das Chromatogramm (s. Abb. 1) gibt noch keinen genauen Hinweis über die mutmaßliche Fettsäure-Zusammensetzung, jedoch ist an der stärkeren Anfärbung der zwei obersten Flecken bei den Gesamtfettsäuren des Schweinehirns erkennbar, daß vermutlich ein beträchtlicher Anteil an dreifach- und höherungesättigten Fettsäuren vorliegt. Zur genauen Bestimmung der einzelnen ungesättigten Fettsäuren eignet sich dieses Trennverfahren vor allem wegen des Auftretens der schon erwähnten Kritischen Paare jedoch ebensowenig wie alle anderen auf dem Prinzip der Umkehrphasenchromatographie basierenden Trennverfahren.

Nach der Isolierung der Gesamtfettsäuren wurden diese sofort mit Diazomethan methyliert und die erhaltenen Gesamt-Methylester der Tiefkühlfraktionierung aus Aceton bei -25°C unterworfen.

Die so erhaltenen ungesättigten Methylester wurden ebenfalls dünn-schicht-chromatographisch untersucht. Für diesen Zweck entwickelten wir das Laufmittel Ameisensäure/Acetonitril/Aceton (2:2:1). Die Auftrennung erfolgte wieder über paraffin-imprägnierte Kieselgurplatten, die Anfärbung mit OsO_4 .



DC der ungesättigten Ester von Schweinehirn

- LM: As / AN / A (2:2:1)
- 1: Ölsäure-Methylester
- 2: Linolsäure-Methylester
- 3: Linolensäure-Methylester
- 4: Unges. Methylester von Schweinehirn

Wie ein Vergleich der Abb. 1 und 2 zeigt, ähnelt das Chromatogramm der ungesättigten Ester sehr dem der Gesamt-Fettsäuren. Da auch hier das Auftreten von Kritischen Paaren angenommen werden muß, lassen sich auch mit diesem Verfahren die einzelnen ungesättigten Ester nicht näher identifizieren. Insgesamt geben aber diese beiden von uns entwickelten Trennverfahren eine wesentlich bessere Abgrenzung der Flecken auf der Platte als die bisherigen Methoden und eignen sich gut zur orientierenden Kontrolle eventuell vorliegender ungesättigter Fettsäuren bzw. Ester. Das zweite der von uns entwickelten Laufmittel (Ameisensäure/Acetonitril/Aceton (2:2:1)) wurde außerdem ein wichtiger Bestandteil unserer im Folgenden weiter beschriebenen Mikromethode.

2. Darstellung und Trennung der Quecksilber-Addukte

Ein Teil der ungesättigten Ester wurde nach der Methode von JANTZEN und ANDREAS (114) durch Behandlung mit Quecksilber-II-Azetat in methanolischer Lösung in ihre Quecksilber-Addukte überführt. Für die dünnschichtchromatographische Trennung der Addukte entwickelten wir das Laufmittel Isobutanol/Ameisensäure/Wasser (100 : 0,5 : 15,7). Die Trennung selbst erfolgt aufsteigend auf Platten mit einer aus Kieselgel und Kieselgur im Verhältnis (3:7) bestehenden Dünnschicht. Die Kombination beider Adsorbentien war notwendig, da sich Kieselgel allein als zu starkes und Kieselgur als zu schwaches Adsorbens erwiesen hatten. Außerdem ist Kieselgel allein wegen seiner sauren Eigenschaften für die Auftrennung der relativ säureempfindlichen Quecksilber-Addukte wenig geeignet. Die aufgetrennten Addukte wurden nach dem Chromatographieren durch Besprühen der Platte mit isobutanolischer Diphenylcarbazonlösung sichtbar gemacht.

Das Schema dieser Addukttrennung ist in Abb. 3 wiedergegeben.

Wie sich in Abb. 3 zeigen läßt, ist es mit der angegebenen Methode möglich, die Quecksilber-Addukte aller natürlich vorkommenden Fettsäuren sowohl nach ihrer Kettenlänge (C_{16} - C_{22}) als auch nach ihrer Doppelbindungszahl (1 - 6 Doppelbindungen) voneinander zu trennen.

Im Einzelnen ergibt sich folgendes Resultat:

Unmittelbar unter der Laufmittelfront bei $R_F = 0,96 - 0,91$ über allen Addukten liegen die gesättigten Fettsäuremethylester, die aus diesem Grunde vor der Addukt-Bereitung nicht quantitativ entfernt werden müssen. Im R_F -Bereich von $0,82 - 0,74$ folgen die Monoen-Addukte, zwischen $0,74 - 0,64$ die Dien-Addukte, im Bereich von $0,68 - 0,43$ die Trien-Addukte, von $0,49 - 0,20$ die Tetraen-Addukte, zwischen $0,26 - 0,12$ die Pentaen-Addukte und unmittelbar über der Startlinie zwischen $0,10 - 0,03$ die Hexaen-Addukte.

**Kieselgel-Kieselgur-Dünnschichtchromatographie
von Polyensäure-Me-Hg(II)-Addukten**

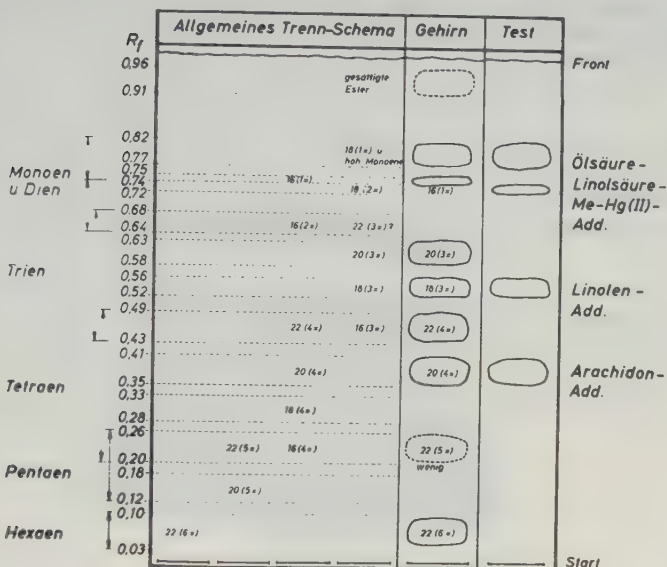


Abb. 3

Schema der Hg-Addukt-Trennung

Ähnlich wie bei den Fettsäuren und Fettsäuremethylestern treten auch bei den Quecksilber-Addukten Kritische Paare auf. Es handelt sich hierbei aber nur um höchstens drei Paare, nämlich $C_{16}(4=)$ und $C_{22}(5=)$, $C_{16}(3=)$ und $C_{22}(4=)$ sowie vermutlich auch $C_{16}(2=)$ und $C_{22}(3=)$.

Diese Kritischen Addukt-Paare unterscheiden sich aber nicht wie bei den freien Fettsäuren und Estern durch zwei C-Atome und eine Doppelbindung, sondern durch 6 C-Atome und eine Doppelbindung. Weiterhin treten sie nur relativ selten auf. So wurde von den drei möglichen Kritischen Adduktpaaren (s. o.) bei unseren späteren Untersuchungen nur eines, nämlich $C_{16}(4=)$ und $C_{22}(5=)$, angetroffen. Die beiden anderen Paare ($C_{16}(3=)$ und $C_{22}(4=)$ bzw. $C_{16}(2=)$ und $C_{22}(3=)$) dürften ebenfalls nur selten vorkommen, weil die betreffenden C_{22} -Fettsäuren als typische tierische Fettsäuren bisher in keiner höheren Pflanze und auch nur selten in Algen gefunden wurden.

Die Bestimmung der Kritischen Adduktpaare wird auf S. 21 beschrieben. In Abb. 4 ist die Auftrennung der Quecksilber-Addukte von Schweinehirn wiedergegeben.

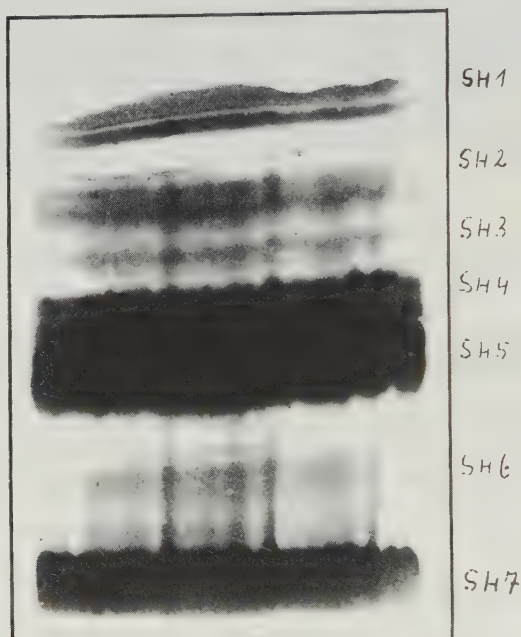


Abb. 4

DC der Hg-Add. von Schweinehirn ^{x)}

LM: IB / AS / W (100 : 0,5 : 15,7)

Zone SH1 = C₁₈(1=), C₁₆(1=) und C₁₆(2=)

Zone SH2 = C₂₀(3=); Zone SH3 = C₁₈(3=)

Zone SH4 = C₂₂(4=); Zone SH5 = C₂₀(4=)

Zone SH6 = C₂₂(5=); Zone SH7 = C₂₂(6=)

x) Zur besseren Übersicht wurden die einzelnen Adduktzonen des Schweinehirns mit SH1 - SH7 bezeichnet. Diese Bezeichnungen wurden auch später bei den aus diesen Adduktzonen regenerierten Estern beibehalten.

Die genaue Bestimmung der aufgetrennten Einzel-Addukte gelingt, wenn man die Zonen mit den Einzel-Addukten aus der Platte isoliert, die ungesättigten Einzel-Ester durch Spaltung der Addukte mit verdünnter Salzsäure wieder in Freiheit setzt ("regeneriert") und diese mit Hilfe der Alkaliisomerisation, erneuter Dünnschichtchromatographie und Gas-Chromatographie identifiziert.

Um die Zahl der Doppelbindungen zu bestimmen, werden die regenerierten Einzelester der Alkaliisomerisation unterworfen. Wir bedienen uns dabei im Prinzip der von HOMAN und HAYES (130) angegebenen Mikromethode. Für die gleichzeitige Isomerisation mehrerer Proben diene eine im experimentellen Teil näher beschriebene Versuchsanordnung.

In Abb. 5 sind die Alkaliisomerisationskurven der regenerierten Einzelester von Schweinehirn wiedergegeben. Die im Bereich zwischen 220 und 400 m μ auftretenden Absorptionsmaxima sind ein Maß für die Zahl der vorhandenen Doppelbindungen. Die nachfolgende Tabelle 1 gibt zunächst einen Überblick über den Zusammenhang zwischen der Doppelbindungszahl und den entsprechenden Absorptionsmaxima.

Doppelbindungszahl	Haupt-Maxima
2	231 m μ
3	268 und 280 m μ
4	300 und 314 m μ
5	329 und 345 m μ
6	352 und 373 m μ

Tab. 1

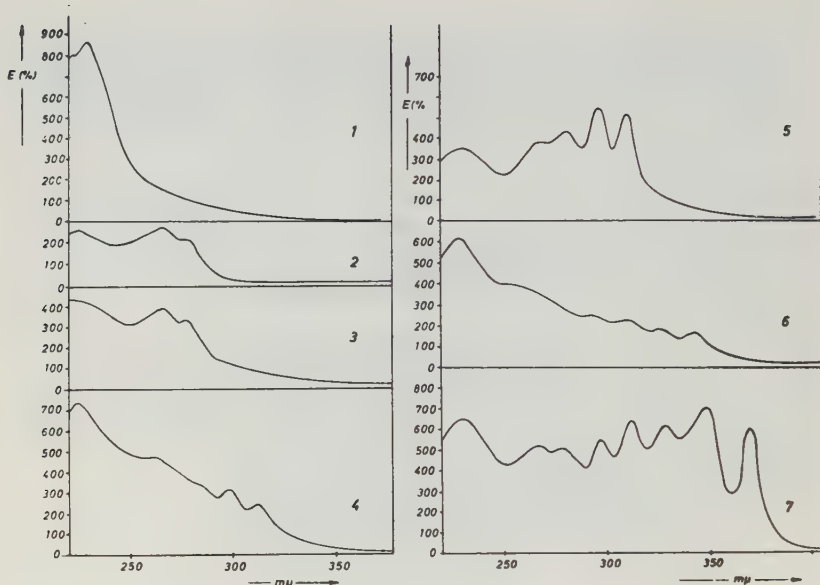


Abb. 5

Alkaliisomerisationskurven der regenerierten Einzel-Ester von Schweinehirn

- 1: SH1 = C₁₆(1=), C₁₆(2=) und C₁₈(1=)
 2: SH2 = C₂₀(3=); 3: SH3 = C₁₈(3=)
 4: SH4 = C₂₂(4=); 5: SH5 = C₂₀(4=)
 6: SH6 = C₂₂(5=); 7: SH7 = C₂₂(6=)

3. Identifizierung der aufgetrennten Quecksilber-Addukte

Die Identifizierung der aufgetrennten Einzel-Addukte ist z.T. bereits durch chromatographischen Vergleich mit Test-Addukten möglich, wie aus dem nachfolgenden Chromatogramm hervorgeht.

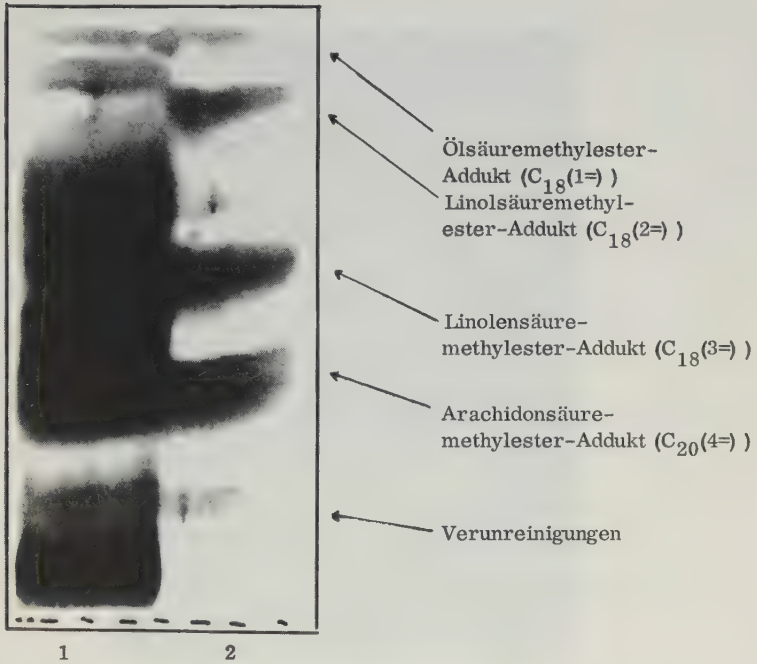


Abb. 6

DC der Hg-Add. von Schweinehirn und von Test-Addukten

LM: IB / AS / W (100 : 0,5 : 15,7)

1: Hg-Add. von Schweinehirn

2: Mischung der Test-Add. (Öl-, Linol-, Linolen- und Arachidon-Addukt)

Da normalerweise nicht alle möglichen Polyenfettsäure-Addukte für Vergleichszwecke zur Verfügung stehen und außerdem Kritische Adduktpaare auftreten können, ist es notwendig, die Addukte noch auf andere Weise zu identifizieren. Zu dieser weiteren Identifizierung wurden die ungesättigten Einzelester aus den aufgetrennten Addukten regeneriert und erneut im Laufmittel Ameisensäure/Acetonitril/Aceton (2:2:1) auf paraffin-imprägnierten Kieselgur-Platten zusammen mit Test-Estern und einer Probe der ungesättigten Ester von Schweinehirn chromatographiert.

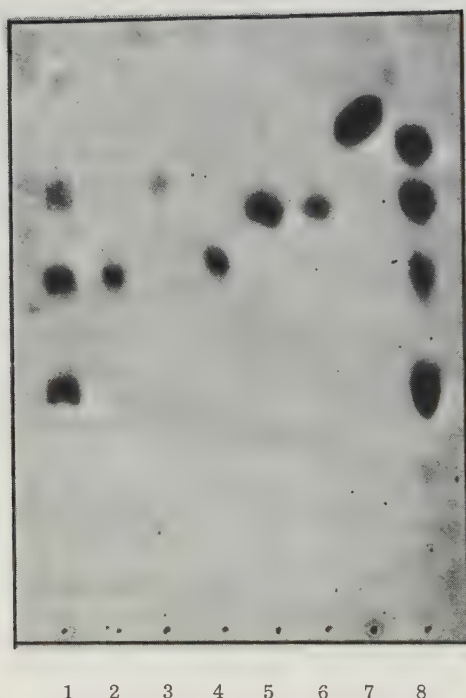


Abb. 7

DC der aus den Hg-Add. regenerierten Einzel-Ester von Schweinehirn

LM: AS / AN / A (2:2:1)

1: Test-Ester (Öl-, Linol- und Linolensäuremethyl-Ester)

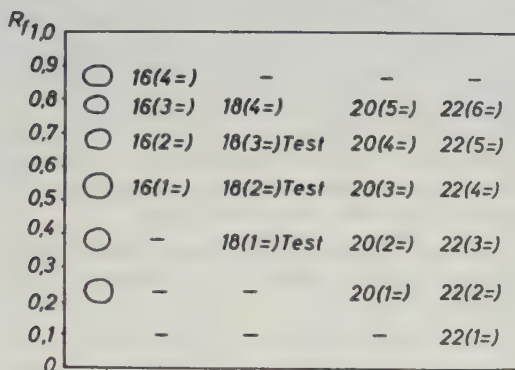
2: SH2 = $C_{20}(3=)$ (vergl. Abb. 4); 3: SH3 = $C_{18}(3=)$;

4: SH4 = $C_{22}(4=)$; 5: SH5 = $C_{20}(4=)$; 6: SH6 = $C_{22}(5=)$;

7: SH7 = $C_{22}(6=)$; 8: Ungesättigte Gesamtester von Schweinehirn

Aus den RF-Werten der regenerierten und erneut chromatographierten Einzel-Ester (s. Abb. 7) kann man bei Kenntnis der mit Hilfe der Alkaliisomerisation ermittelten Doppelbindungszahl die Kettenlänge für jeden Ester bestimmen.

**Dünnschichtchromatographie
der ungesättigten Fettsäure-Ester auf
paraffin-imprägnierten Kieselgur-Platten**



**System: Ameisensäure:Acetonitril:Aceton
(2:2:1)**

Abb. 8

Wie aus Abb. 8 ersichtlich ist, sinken bei Zunahme der Kettenlänge um 2 C-Atome die RF-Werte der ungesättigten Ester um jeweils eine "RF-Einheit"¹⁾, wie z. B. bei den Estern C₁₆(3=), C₁₈(3=), C₂₀(3=) und C₂₂(3=). Bei Kettenverkürzung um 2 C-Atome erhöhen sich die RF-Werte um eine Einheit.

Bei Einführung einer weiteren Doppelbindung in das Ester-Molekül hingegen steigen die RF-Werte um die gleiche RF-Einheit, wie z. B. bei den Estern C₁₆(1=), C₁₆(2=), C₁₆(3=) und C₁₆(4=). Bei gleichzeitiger Kettenverlängerung um 2 C-Atome und Einführung einer weiteren Doppelbindung bleibt der RF-Wert unverändert. Auf diese Weise entstehen die obigen Kritischen Paare

1) Als "RF-Einheit" ist in Abb. 8 z. B. der RF-Unterschied zwischen den ungesättigten Estern C₁₆(1=) und C₁₆(2=) zu verstehen.

mit nahezu gleichen RF-Werten ²⁾.

Hat man z. B. gefunden, daß der RF-Wert eines regenerierten Einzel-Esters mit dem des C₁₈(3=)-Testesters übereinstimmt, so könnte es sich (s. Abb. 8) um die Ester C₁₆(2=), C₁₈(3=), C₂₀(4=) oder C₂₂(5=) handeln. Wenn man zuvor mit Hilfe der Alkaliisomerisation eine Tetraenverbindung festgestellt hat, so muß es sich um den C₂₀(4=)-Ester handeln. Man kann somit die Bildung der Kritischen Paare analytisch auszunutzen und die Einzelester ohne Zuhilfenahme der Gaschromatographie allein durch die beiden dünnschichtchromatographischen Verfahren und die Alkaliisomerisation bestimmen. Liegt ein Kritisches Adduktpaar vor, wie z. B. C₁₆(4=) und C₂₂(5=), so werden natürlich beide Ester zusammen regeneriert. Bei der erneuten Chromatographie haben diese zwei Ester dann zwei verschiedene RF-Werte, die um zwei RF-Einheiten auseinander liegen (s. S. 68).

Zur Bestätigung der durch die Alkaliisomerisation und erneute Dünnschichtchromatographie erzielten Ergebnisse wurden die regenerierten Einzelester gaschromatographisch untersucht.

Die gaschromatographische Analyse bestätigte in jedem Falle, daß die regenerierten Einzel-Ester aus den Adduktzonen in reiner Form erhalten wurden.

Wegen der dicht beieinanderliegenden RF-Werte wurden die Ester aus der Addukt-Zone SH1 (s. Abb. 4) (C₁₆(1=), C₁₈(1=) und C₁₆(2=)) zusammen regeneriert.

In Übereinstimmung mit den Literatur-Angaben (21, 33) ermittelten wir mit Hilfe unserer Mikromethode bei dem als Modell dienenden Schweinehirn folgende Zusammensetzung der ungesättigten Fettsäuren:

Zusammensetzung der ungesättigten Fettsäuren von Schweinehirn

- C₁₆(1=) und C₁₆(2=)
- C₁₈(1=) und C₁₈(3=)
- C₂₀(3=) und C₂₀(4=)
- C₂₂(4=), C₂₂(5=) und C₂₂(6=)

2) Bei der von uns benutzten Dünnschichtchromatographie der ungesättigten Ester ergab es sich, daß die Kritischen Paare doch nicht den völlig gleichen RF-Wert haben. Bei allen unseren Untersuchungen hatten nämlich die Ester mit der längeren Kohlenstoffkette und der höheren Doppelbindungszahl einen etwas niedrigeren RF-Wert als ihre Kritischen Partner (s. z. B. S. 61 bei Halimeda Tuna). Diese RF-Unterschiede sind aber so gering, daß die Kritischen Paare bei der Dünnschichtchromatographie der ungesättigten Gesamt - Ester immer noch einen gemeinsamen Fleck bilden. Die Kritischen Paare liegen aber (s. Abb. 56 , S. 61) meist in einer etwas abfallenden Linie.

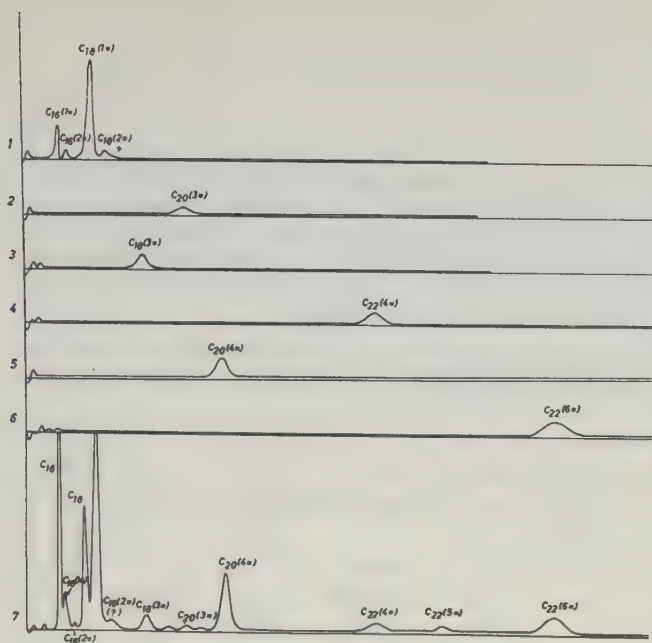


Abb. 9

Gas-Chromatographie der regenerierten Einzel-Ester von Schweinehirn

- 1: SH1 = $C_{16}(1=)$, $C_{18}(1=)$ u. $C_{16}(2=)$
 2: SH2 = $C_{20}(3=)$, 3: SH3 = $C_{18}(3=)$, 4: SH4 = $C_{22}(4=)$
 5: SH5 = $C_{20}(4=)$, 6: SH6 = $C_{22}(5=)$, 7: SH7 = $C_{22}(6=)$
 8: Ungesättigte Ester von Schweinehirn

D) UNTERSUCHUNG VON 16 MEERES-ALGEN AUF DIE ZUSAMMENSETZUNG IHRER UNGESÄTTIGTEN FETTSÄUREN

Mit Hilfe der unter C) beschriebenen Mikromethode wurden 5 Algen aus dem Stamm der Rhodophyta, 5 Algen aus dem Stamm der Phaeophyta und 6 Algen aus dem Stamm der Chlorophyta untersucht.

Die vier aus Chile stammenden Algen waren an freier Luft getrocknet und dann nach München geschickt worden. Hier wurden sie sofort gemahlen und extrahiert.

Die anderen 12 Algen wurden während des Arbeitsaufenthaltes an der Zoologischen Station in Neapel gesammelt, dort auf ihre botanische Einheitlichkeit untersucht und dann sofort in frischem Zustande extrahiert. Wir wählten das Verfahren der Frischextraktion, weil es wesentlich rascher verläuft als die Extraktion von getrockneten Algen. Darüberhinaus konnte die Zeit für die Gefriertrocknung eingespart werden.

In Tabelle 2 wird ein Überblick über die Art, Herkunft und das Gewicht der untersuchten Meeres-Algen gegeben.

Tab. 2 : Art, Herkunft und Gewicht der Algen

Alge	Suchtag	Fundort	Frischgewicht (g)	Trockengew. (g)	Getrockneter Rückstand (g)
<u>(Rhodophyta)</u>					
Gigartina Teedii (Roth.) Lamour.	5.3. 1964	Neapel	338,0	51,0	47,0
Gracilaria confervoides (L.) Grev. (fertil)	19.5. 1964	"	533,0	48,0	38,0 ^{x)}
Gracilaria confervoides (L.) Grev. (steril)	19.5. 1964	"	533,0	48,0	32,2 ^{x)}
Porphyra columbina Agardh	Sommer 1962	Chile	--	230,0	--
Sebdenia Monardiana (Mont.) Berth.	17.3. 1964	Neapel	560,0	54,0	41,0

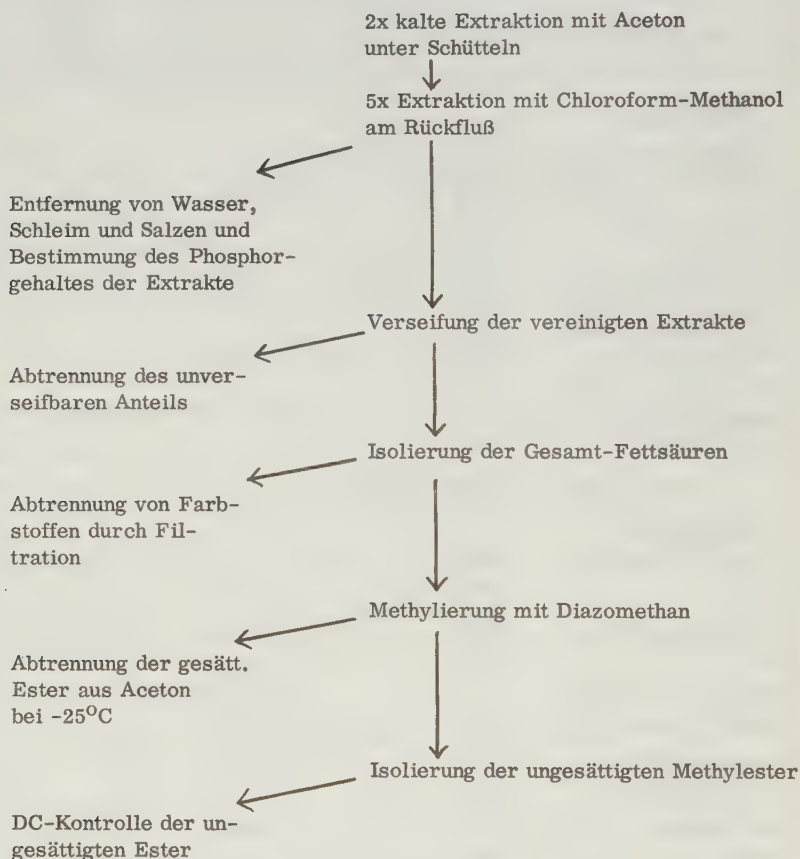
x) (s. Tab. 2) Der Unterschied der Rückstände erklärt sich dadurch, daß das Frischmaterial von Gracilaria confervoides (steril) einen Tag länger in kaltem Aceton stand, weshalb wahrscheinlich mehr Schleim mit dem Wasser herausgelöst wurde.

Fortsetzung der Tabelle 2 von Seite 23

Alge	Such- tag	Fund- ort	Frisch- Gewicht (g)	Trok- ken- Gew. (g)	Getrock- neter Rück- stand (g)
<u>(Phaeophyta)</u>					
Colpomenia sinuosa (Roth.) Derb. et Sol.	25.3. 1964	Neapel	1170,0	30,0	21,0
Cutleria multifida (Sm.) Grev.	22.3. 1964	"	582,0	65,0	16,0
Lessonia fusca Bory	Sommer 1962	Chile	--	96,0	--
Padina pavonia (L.) Lamour.	10.3. 1964	Neapel	400,0	38,0	32,0
Sargassum linifo- lium (Thurn.) J. Ag.	24.3. 1964	"	583,0	65,0	54,2
<u>(Chlorophyta)</u>					
Codium Stackhouse	Sommer 1962	Chile	--	91,0	--
Codium elongatum Ag.	10.3. 1964	Neapel	303,0	37,0	25,0
Halimeda Tuna (Ellis et Sol.) Lamour.	5.3. 1964	"	615,0	110,0	92,0
Udotea petiolata (Trev.) Boerg.	5.3. 1964	"	340,0	35,0	28,0
Ulva fasciata Delile	12.3. 1964	"	200,0	36,0	29,0
Ulva lactuca L.	Sommer 1962	Chile	--	350,0	--

Die Extraktion der Algen und die Isolierung der ungesättigten Methylester erfolgte nach dem folgenden Schema 2 :

Schema 2 : Darstellung der ungesättigten Methylester aus Algen



In Tab. 3 sind die Gewichtsmengen der Aceton- und Chloroform-Methanol-Extrakte sowie ihre Phosphorgehalte aufgeführt.

Tab. 3 : Übersicht über die Algen-Extrakte

Alge	Aceton- Extr. (g)	P- Gehalt (%)	Chloro- form - Meth. - Extr. (g)	P- Gehalt (%)	Vereinigte Extrakte (%-Gehalt bezogen auf Trocken-Gew.)
<u>(Rhodophyta)</u>					
Gigartina T.	0,16	0,09	0,69	0,33	1,65
Gracilaria c. (fertil)	0,62	0,73	1,83	0,71	5,1
Gracilaria c. (steril)	0,51	0,80	1,75	0,56	4,7
Porphyra c.	1,60	0,11	16,40	0,28	7,8
Sebdenia M.	0,80	0,29	4,62	0,28	10,0
<u>(Phaeophyta)</u>					
Colpomenia s.	1,47	0,43	0,65	0,41	7,1
Cutleria m.	1,45	0,68	10,66	0,90	18,7
Lessonia f.	1,50	0,17	9,70	0,17	11,7
Padina p.	1,27	0,15	1,02	0,14	6,0
Sargassum l.	2,45	0,11	3,43	0,18	9,0
<u>(Chlorophyta)</u>					
Codium St.	2,05	0,01	9,60	0,12	12,8
Codium e.	1,00	0,31	4,02	0,49	13,6
Halimeda T.	1,02	0,07	6,00	0,44	6,4
Udotea p.	0,80	0,25	3,40	0,41	12,0
Ulva f.	0,45	0,41	3,90	0,17	12,1
Ulva l.	1,90	0,05	20,50	0,03	6,0

Zwischen den Algenstämmen waren keine auffälligen Unterschiede in den Extraktausbeuten zu beobachten, obwohl innerhalb jedes Stammes Arten mit relativ hohen und niedrigen Lipoidvorkommen abwechselten. Die Extraktausbeuten betrugen bei den Algen aus Chile durchschnittlich etwa 9,5 % und bei denen aus Neapel etwa 9 %, bezogen auf das Algen-Trockengewicht. Überraschenderweise waren die Phosphorgehalte der Aceton-Extrakte ungefähr gleich hoch oder sogar höher als bei den Chloroform-Methanol-Extrakten. Dieser ungewöhnliche Befund kann nur so erklärt werden, daß bei der Aceton-Frischextraktion die in großer Menge vorkommenden oberflächenaktiven Alginsäuren und Sulfolipide auf die Phosphatide lösungsvermittelnd wirken.

Da die Gesamt-Fettsäuren durch Pflanzenfarbstoffe (Chlorophyll, Karotinoide) stark verunreinigt waren, entwickelten wir eine schnell durchführbare Reinigungsmethode: Die Petrolätherlösung der Gesamt-Fettsäuren wurde durch ein im experimentellen Teil beschriebenes, aus Quarzpulver und Kohle bestehendes Filter gesaugt und dadurch von allen Farbstoffen befreit.

Die so gereinigten Fettsäuren wurden anschließend sofort mit Diazomethan methyliert. Die weitere Behandlung der Methylester erfolgte so, wie es schon bei der Untersuchung des Schweinehirns beschrieben worden ist: Nach der Gewichtsbestimmung der Gesamtester wurden die gesättigten Ester aus Aceton bei -25°C ausgefällt und gewogen. Das Gewicht der ungesättigten Ester wurde aus der Gewichts Differenz von Gesamt-Estern und gesättigten Estern berechnet. Tabelle 4 gibt eine Übersicht über die Gewichte des unverseifbaren Anteiles und der Methylester:

Wie aus Tab. 4 hervorgeht, beträgt der Anteil der ungesättigten Ester an den Gesamt-Estern bei allen Algen übereinstimmend etwa 80%. Der Anteil der ungesättigten Ester, bezogen auf das Gewicht der vereinigten Extrakte, beträgt bei den Chile-Algen durchschnittlich 6 %, bei den Neapel-Algen dagegen etwa 19 %. D.h. bei etwa gleichgroßen Extraktausbeuten (9 %) enthielten die Extrakte der Neapel-Algen mehr als dreimal so viele ungesättigte Fettsäuren wie die der Chile-Algen.

Der Anteil der ungesättigten Ester, bezogen auf das Trockengewicht der Algen, beträgt bei den Chile-Algen im Durchschnitt 0,54 %, bei den Neapel-Algen hingegen 2,1 %. Hier ist der Gehalt an ungesättigten Fettsäuren sogar viermal größer als bei den Chile-Algen.

Es ist zu vermuten, daß diese beträchtlichen Unterschiede nicht auf der unterschiedlichen Herkunft der Algen beruhen, da ja alle Algen etwa gleichviel Extraktmengen lieferten (Chile-Algen 9,5 %, Neapel-Algen 9 %). Vielmehr dürften diese Unterschiede auf die verschiedenartige Aufarbeitung der Algen zurückzuführen sein. Vermutlich wurden die ungesättigten Fettsäuren der Chile-Algen im Verlauf des Trocknens an freier Luft und während des Transportes zu einem beträchtlichen Teil oxydativ zersetzt.

Tab. 4

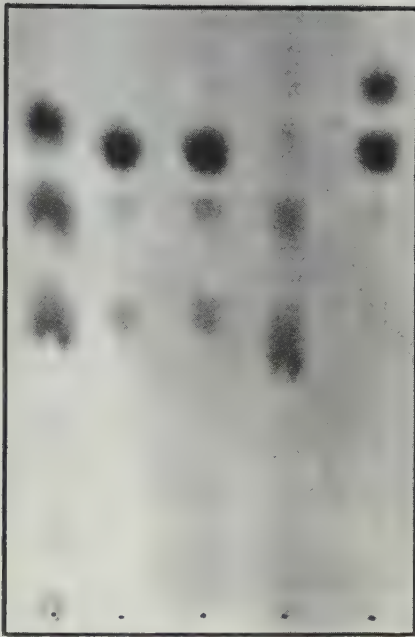
	Unver- seifb. Anteil. (g)	Gesamt- Ester Gew. (g)	(%) ^{x)}	Gesätt. Ester (g)	Ungesättigte Ester Gew. (g)	(%) ^{x)}
<u>(Rhodophyta)</u>						
Gigartina T.	0,13	0,223	26,2	0,011	0,212	25,0
Gracilaria c. (fertil)	0,60	0,770	31,4	0,303	0,467	19,4
Gracilaria c. (steril)	0,78	0,633	28,0	0,172	0,461	20,3
Porphyra c.	0,62	0,93	5,2	0,34	0,59	3,3
Sebdenia M.	0,05	0,81	15,0	0,11	0,70	12,9
<u>(Phaeophyta)</u>						
Colpomenia s.	0,44	0,89	42,0	0,20	0,69	32,5
Cutleria m.	0,91	0,74	6,1	0,14	0,60	5,0
Lessonia f.	0,31	0,51	4,6	0,10	0,41	3,7
Padina p.	0,50	0,63	27,5	0,13	0,50	21,8
Sargassum l.	0,90	1,87	31,8	0,25	1,62	27,5
<u>(Chlorophyta)</u>						
Codium St.	0,82	1,03	8,8	0,27	0,76	6,5
Codium e.	0,60	0,90	18,0	0,14	0,76	15,1
Halimeda T.	0,50	1,00	14,3	0,16	0,84	12,0
Udotea p.	0,51	0,82	19,5	0,08	0,74	17,6
Ulva f.	0,40	0,88	20,2	0,12	0,76	17,5
Ulva l.	1,96	2,84	13,3	0,64	2,20	10,3

x) Bezogen auf das Gewicht der vereinigten Aceton- und Chloroform-Methanol-Extrakte.

Ebenso wie bei der Untersuchung des Schweinehirns wurden die ungesättigten Ester zunächst dünnschichtchromatographisch im Laufmittel Ameisensäure/Acetonitril/Aceton (2:2:1) kontrolliert. Anschließend wurde ein Teil der ungesättigten Ester in ihre Quecksilber-Addukte überführt und diese dünnschichtchromatographisch im Laufmittel Isobutanol/Ameisensäure/Wasser (100 : 0,5 : 15,7) aufgetrennt. Die aus den aufgetrennten Addukten regenerierten Einzelester wurden wiederum durch Alkaliisomerisation, erneute Dünnschichtchromatographie und Gas-Chromatographie identifiziert.

E) ANALYSENRESULTATE BEI DEN EINZELNEN MEERESALGEN

In den Abb. 10 - 13 sind zunächst die Dünnschichtchromatogramme der ungesättigten Ester der 12 Algen aus Neapel und der 4 Algen aus Chile wiedergegeben. Obwohl diese Chromatogramme wegen der auftretenden Kritischen Paare nur wenig Aussagekraft haben, lassen sich doch schon einige Besonderheiten in der Zusammensetzung der ungesättigten Fettsäuren erkennen. So differieren die Algen der Rhodophyta (Abb. 10) deutlich untereinander, während die Algen der Phaeophyta bzw. der Chlorophyta untereinander z. T. große Übereinstimmung zeigen. Auch zwischen den drei Stämmen zeigen sich bereits Unterschiede.



1 2 3 4 5

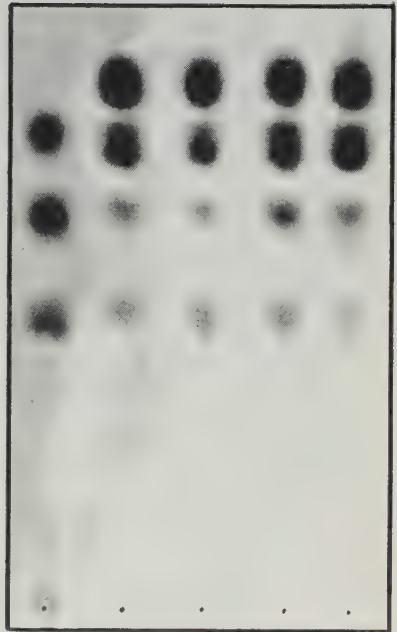
Abb. 10

Rhodophyta (Neapel)

DC der unges. Ester

LM: AS / AN / A^{x)}
(2:2:1)

- 1: Test-Ester
- 2: Gracilaria confervoides
(fertil)
- 3: Gracilaria confervoides
(steril)
- 4: Gigartina Teedii
- 5: Sebdenia Monardiana



1 2 3 4 5

Abb. 11

Phaeophyta (Neapel)

DC der unges. Ester

LM: AS / AN / A
(2:2:1)

- 1: Test-Ester
- 2: Colpomenia sinuosa
- 3: Cutleria multifida
- 4: Padina pavonia
- 5: Sargassum linifolium

x) S. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen auf S. 10

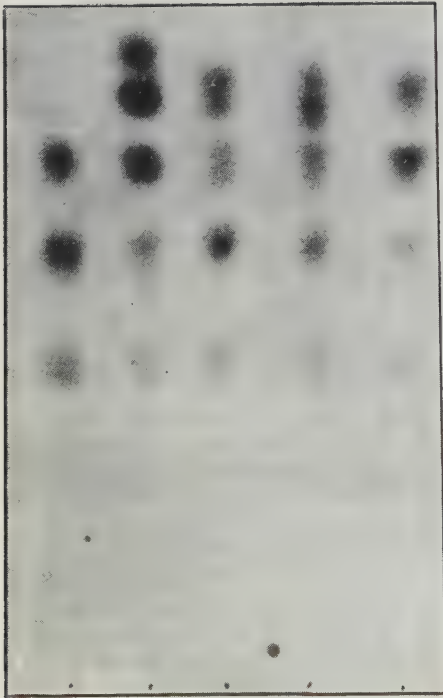


Abb. 12

Chlorophyta (Neapel)

DC der unges. Ester

LM: AS / AN / A
(2:2:1)

- 1: Test-Ester
- 2: *Ulva fasciata*
- 3: *Udotea petiolata*
- 4: *Halimeda Tuna*
- 5: *Codium elongatum*

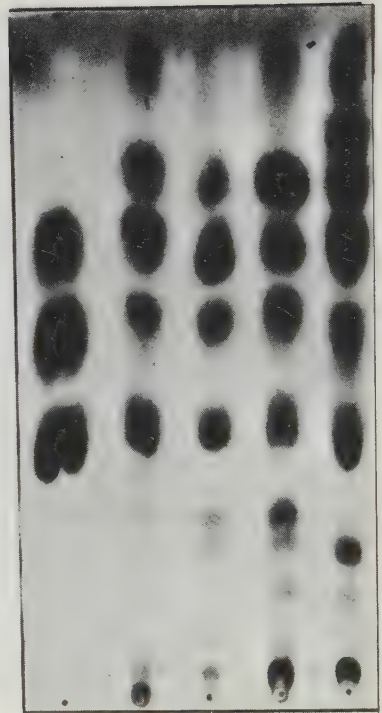


Abb. 13

Algen aus Chile

DC der unges. Ester

LM: AS / AN / A
(2:2:1)

- 1: Test-Ester
- 2: *Codium Stackhouse*
(Chlorophyta)
- 3: *Lessonia fusca*
(Phaeophyta)
- 4: *Porphyra columbina*
(Rhodophyta)
- 5: *Ulva lactuca*
(Chlorophyta)

1. *Gigartina Teedii* (Roth.) Lamour (I) (Rhodophyta)

Wie bei allen folgenden Algen finden sich bei *Gigartina Teedii* die $C_{16}(1=)$ -, $C_{16}(2=)$ -, $C_{18}(1=)$, $C_{18}(2=)$ - und $C_{20}(3=)$ -Fettsäuren. Auffällig an dieser Alge ist vor allem das starke Überwiegen der Ölsäure ($C_{18}(1=)$) und der geringe Gehalt an höherungesättigten C_{18} -Fettsäuren ($C_{18}(3=)$ und $C_{18}(4=)$) sowie an höherungesättigten C_{20} -Fettsäuren ($C_{20}(4=)$ und $C_{20}(5=)$).

Aus diesem Grunde sind in Abb. 14 die Addukte von *Gigartina T.* in zwei verschiedenen Konzentrationen chromatographiert worden. Auch wurden zum Vergleich die Addukte der Grünalge *Halimeda Tuna* mitchromatographiert, da die Grünalgen über einen relativ hohen Gehalt an Polyensäuren der C_{18} - und C_{20} -Reihe verfügen.

Wie aus Abb. 14 hervorgeht, besitzt *Gigartina T.* einen sehr niedrigen Gehalt an $C_{20}(4=)$ (in Zone GT3), an $C_{18}(4=)$ (in Zone GT4) und an $C_{20}(5=)$ (in Zone GT5), während die $C_{18}(1=)$ -Fettsäure (in Zone GT1) überwiegt.

Ebenso wie bei allen nachfolgenden Algen gelten die RF-Werte der aus den Adduktzonen regenerierten Einzel-Ester (s. Abb. 15) und das Gaschromatogramm (s. Abb. 16) als weitere Bestätigung für die Fettsäure-Zusammensetzung.

Bei *Gigartina Teedii* ergab sich folgender Gehalt an ungesättigten Fettsäuren:

$C_{16}(1=)$ und $C_{16}(2=)$
 $C_{18}(1=)$, $C_{18}(2=)$, $C_{18}(3=)$ (-)^{x)}, $C_{18}(4=)$ (-),
 $C_{20}(3=)$, $C_{20}(4=)$ (-) und $C_{20}(5=)$ (-)

x) (-): Nur in geringen Mengen vorhanden

Gigartina Teedii (Roth.) Lamour (II)

(Rhodophyta)

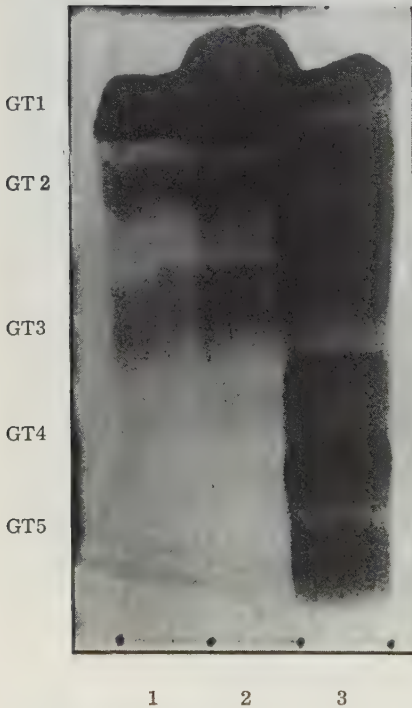


Abb. 14

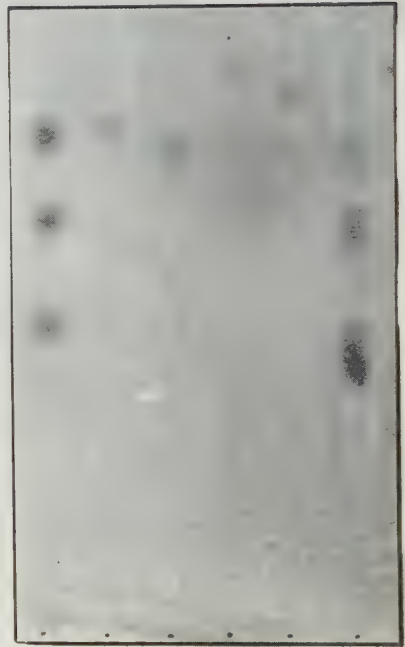


Abb. 15

DC der Hg-Add.

LM: IB / AS / W

(100 : 0, 5 : 15, 7)

- 1: Addukte v. Gigartina T.
(Konz. 1)
- 1: Addukte v. Gigartina T.
(Konz. 2)
- 3: Addukte v. Halimeda Tuna

Zone GT1: C₁₈(1=), C₁₆(1=)
C₁₈(2=) und C₁₆(2=)

Zone GT2: C₁₈(3=)

Zone GT3: C₂₀(4=)

Zone GT4: C₁₈(4=)

Zone GT5: C₂₀(5=)

DC der reg. Ester

LM: AS / AN / A

(2 : 2 : 1)

- 1: Test-Ester
- 2: GT2 = C₁₈(3=)
- 3: GT3 = C₂₀(4=)
- 4: GT4 = C₁₈(4=)
- 5: GT5 = C₂₀(5=)
- 6: Ungesättigte Ester von
Gigartina Teedii

Gigartina Teedii (Roth.) Lamour. (III)

(Rhodophyta)

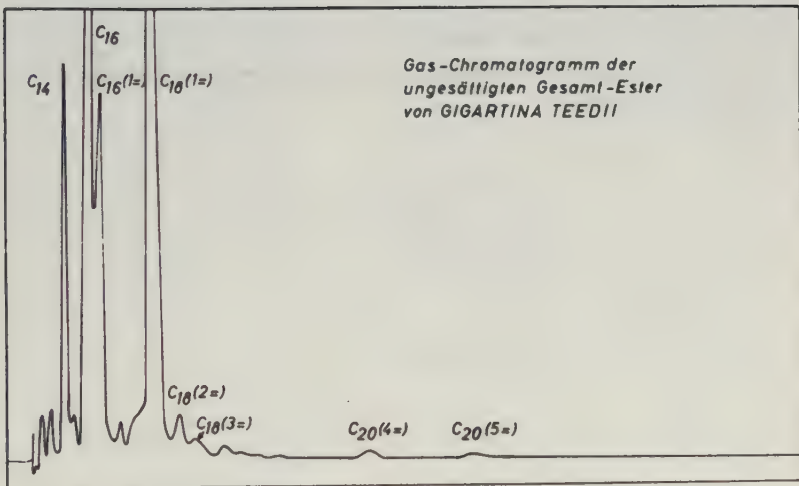


Abb. 16 : Gas-Chromatogramm der ungesättigten Ester

2. *Gracilaria confervoides* (L.) Grev. (fertile Form) (I)

3. *Gracilaria confervoides* (L.) Grev. (sterile Form) (I)

Sehr auffallend ist bei dieser Alge das starke Überwiegen der $C_{20}(4=)$ -Fettsäure, wie es besonders anschaulich aus Abb. 21 hervorgeht. Alle übrigen Fettsäuren sind demgegenüber nur sehr schwach vertreten. Es finden sich kaum höherungesättigte C_{16} - und C_{18} -Fettsäuren.

Bei dieser Alge erschien es interessant, ob zwischen der fertilen und der sterilen Form Unterschiede in der Zusammensetzung der ungesättigten Fettsäuren bestehen. Wie aus den in Abb. 21 nebeneinander aufgetrennten Addukten ersichtlich ist, war kein Unterschied feststellbar.

Die Fettsäure-Zusammensetzung bei den beiden Formen von *Gracilaria confervoides* ist demnach:

$C_{16}(1=)$ und $C_{16}(2=)$

$C_{18}(1=)$, $C_{18}(2=)$ und $C_{18}(3=)$

$C_{20}(3=)$ und $C_{20}(4=)$

Gracilaria confervoides (L.) Grev. (fertile Form) (II)

Gracilaria confervoides (L.) Grev. (sterile Form) (II)

(Rhodophyta)

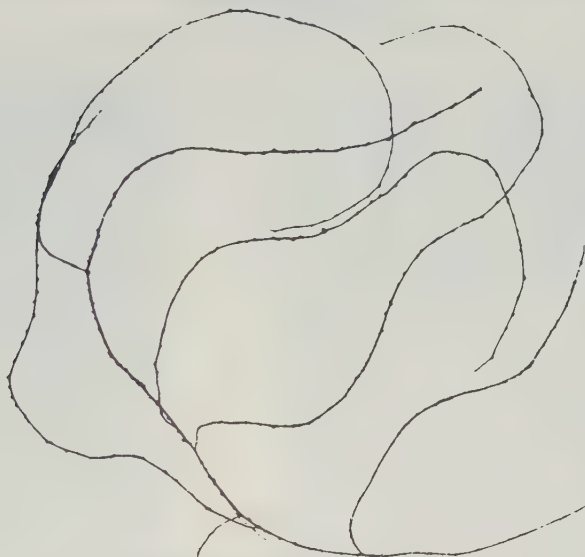


Abb. 17 : Fertile Form

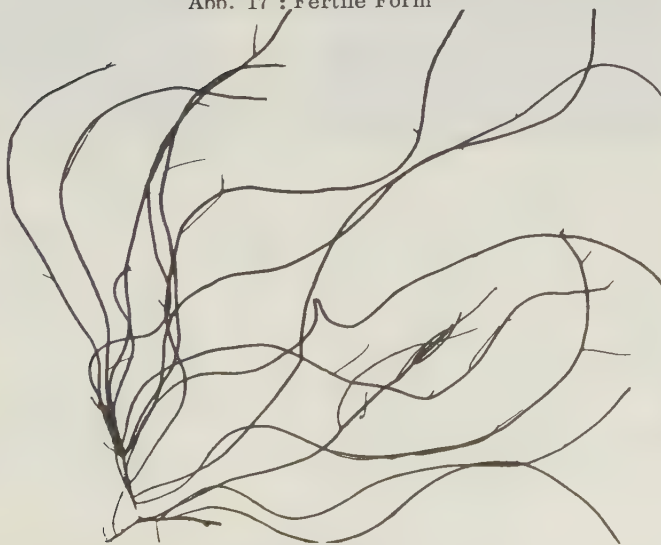


Abb. 18 : Sterile Form

Gracilaria confervoides (L.) Grev. (fertile Form) (III)

Gracilaria confervoides (L.) Grev. (sterile Form) (III)

(Rhodophyta)

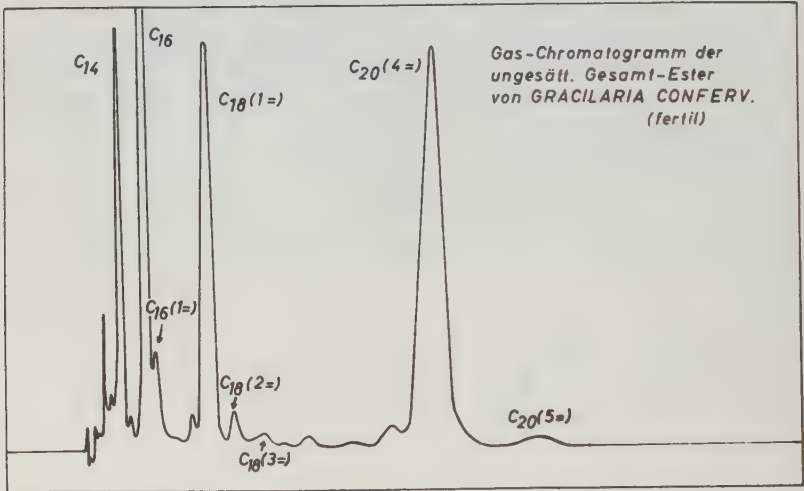


Abb. 19 : Gas-Chromatogramm der ungesättigten Ester der fertilen Form

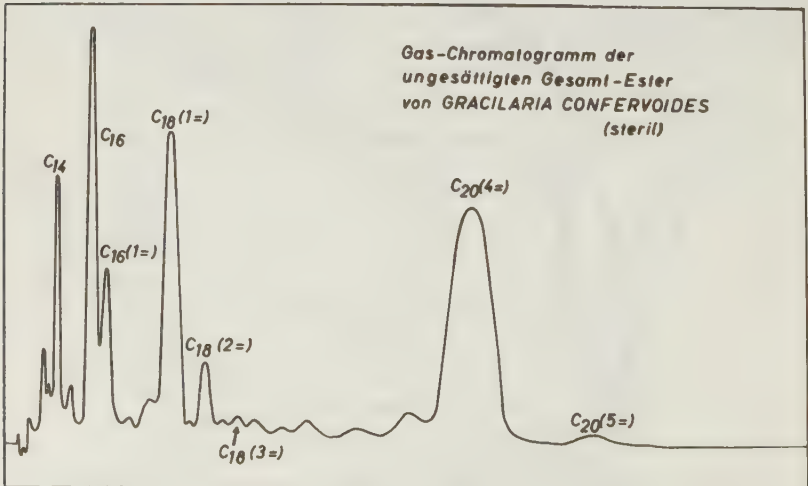
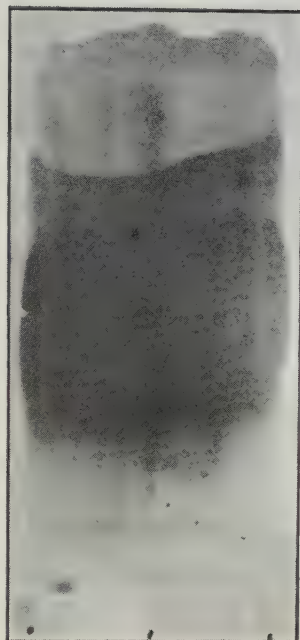


Abb. 20 : Gas-Chromatogramm der ungesättigten Ester der sterilen Form.

Gracilaria confervoides (L.) Grev. (fertile Form) (IV)

Gracilaria confervoides (L.) Grev. (sterile Form) (IV)

(Rhodophyta)



1 2

Abb. 21

DC der Hg-Add.

LM: IB / AS / W

(100 : 0,5 : 15,7)

1: Gracilaria conf. (fertil)

2: " " (steril)

Zone GC1: C₁₈(1=), C₁₆(1=),
C₁₈(2=), C₁₆(2=) u. C₂₀(3=)

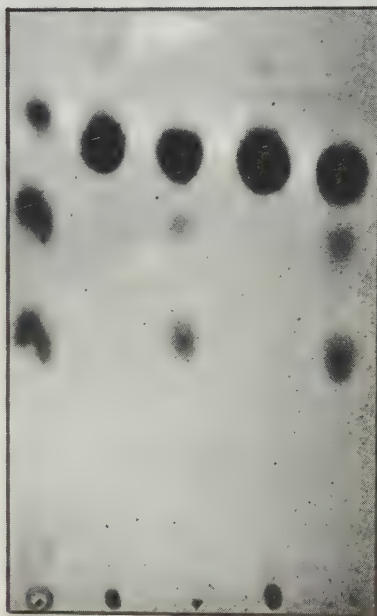
Zone GC2: C₁₈(3=)

Zone GC3: C₂₀(4=)

GC1

GC2

GC3



1 2 3 4 5

Abb. 22

DC der reg. Ester

LM: AS / AN / A

(2 : 2 : 1)

1: Test-Ester

2: GC3 = C₂₀(4=) (fertile Form)

3: Ungesättigte Ester der
fertilen Form

4: GC3 = C₂₀(4=) (sterile Form)

5: Ungesättigte Ester der
sterilen Form

4. *Porphyra columbina* Agardh (I)

(Rhodophyta)

In Abb. 24 sind die Addukte von *Porphyra c.* zusammen mit einer Mischung von Test-Addukten wiedergegeben.

Auffallend ist bei dieser Alge ähnlich wie bei der vorher beschriebenen *Gracilaria confervoides* das starke Überwiegen der C₂₀-Fettsäuren. Allerdings tritt hier neben der C₂₀(4=) - in etwa gleicher Menge auch die C₂₀(5=)-Fettsäure auf. Die höherungesättigten C₁₆- und C₁₈-Fettsäuren (C₁₆(3=), C₁₈(3=) und C₁₈(4=)) fehlen völlig.

Die genaue Fettsäure-Zusammensetzung ist:

C₁₆(1=) und C₁₆(2=)

C₁₈(1=) und C₁₈(2=)

C₂₀(3=), C₂₀(4=) und C₂₀(5=)

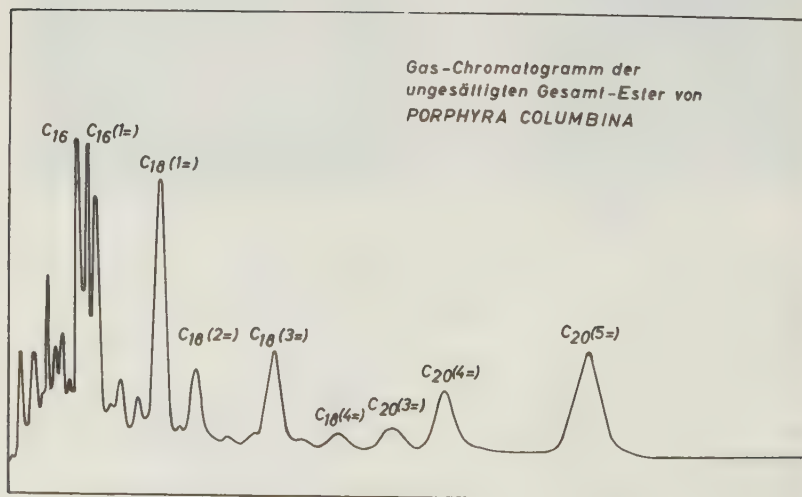
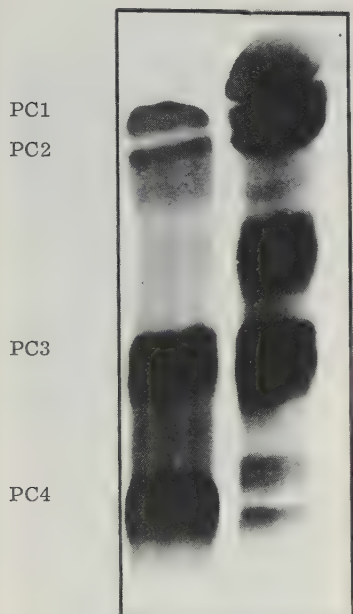
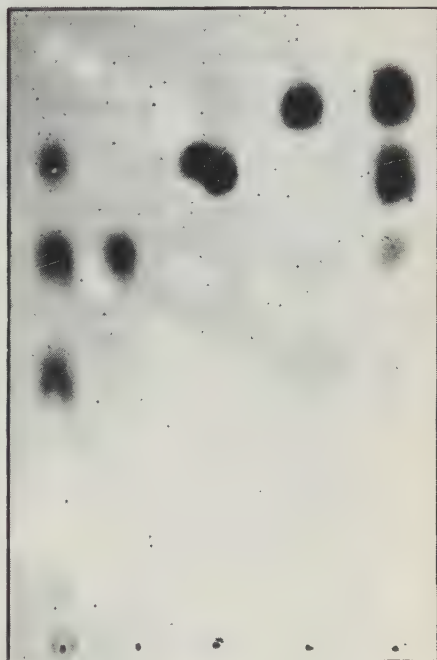


Abb. 23 : Gas-Chromatogramm der ungesättigten Ester

Porphyra columbina Agardh (II)
(Rhodophyta)



1 2
Abb. 24



1 2 3 4 5
Abb. 25

DC der Hg-Add.

LM: IB / AS / W

(100 : 0, 5 : 15, 7)

1: Addukte von Porphyra columbina

2: Mischung von Test-addukten (C₁₈(1=), C₁₈(2=), C₁₈(3=) und C₂₀(4=)

Zone PC1: C₁₈(1=), C₁₆(1=), C₁₈(2=) und C₁₆(2=)

Zone PC2: C₂₀(3=)

Zone PC3: C₂₀(4=)

Zone PC4: C₂₀(5=)

DC der reg. Ester

LM: AS / AN / A

(2 : 2 : 1)

1: Test-Ester

2: PC2 = C₂₀(3=)

3: PC3 = C₂₀(4=)

4: PC4 = C₂₀(5=)

5: Unges. Ester von Porphyra columbina

5. *Sebdenia Monardiana* (Mont.) Berth. (I)
(Rhodophyta)

Ähnlich wie bei den zwei vorangegangenen Algen überwiegt auch hier die $C_{20}(4=)$ -Fettsäure (s. Abb. 27). Daneben tritt als weitere C_{20} -Fettsäure vor allem noch die $C_{20}(5=)$ -Fettsäure auf. Wiederum fehlen die höherungesättigten C_{16} - und C_{18} -Fettsäuren, außerdem noch die $C_{16}(2=)$ - und die $C_{20}(3=)$ -Fettsäuren.

Die ungesättigten Fettsäuren setzen sich folgendermaßen zusammen:

$C_{16}(1=)$
 $C_{18}(1=)$, $C_{18}(2=)$ und $C_{18}(3=)$
 $C_{20}(4=)$ und $C_{20}(5=)$



Abb. 26 : *Sebdenia Monardiana*

Sebdenia Monardiana (Mont.) Berth. (II)

(Rhodophyta)



Abb. 27

DC der Hg-Add.

LM: IB / AS / W

(100 : 0,5 : 15,7)

Zone SM1: C₁₈(1=), C₁₆(1=)
und C₁₈(2=)

Zone SM2: C₁₈(3=)

Zone SM3: C₂₀(4=)

Zone SM4: C₂₀(5=)

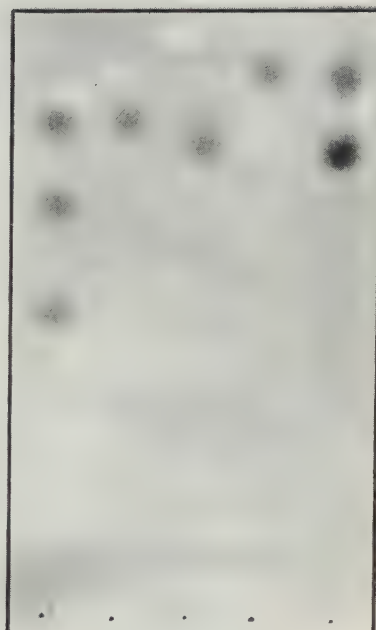


Abb. 28

DC der reg. Ester

LM: AS / AN / A

(2 : 2 : 1)

1: Test-Ester

2: SM2 = C₁₈(3=)

3: SM3 = C₂₀(4=)

4: SM4 = C₂₀(5=)

5: Unges. Ester von Sebdenia
Monardiana

Sebdenia Monardiana (Mont.) Berth. (III)

(Rhodophyta)

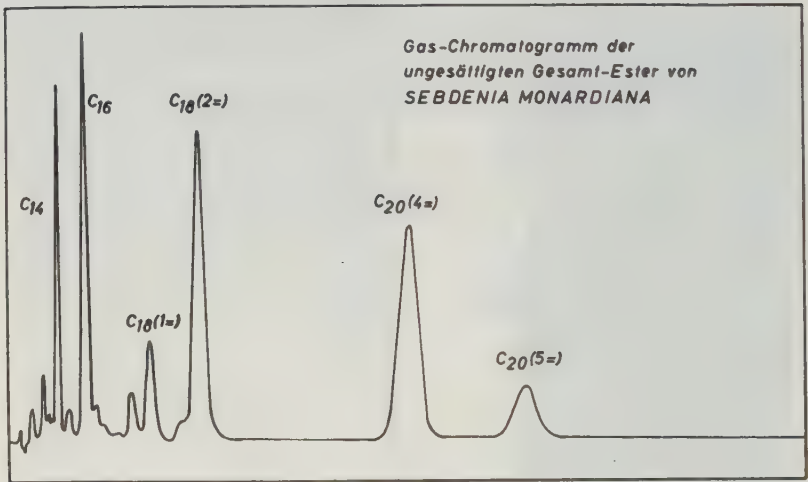


Abb. 29 : Gas-Chromatogramm der ungesättigten Ester

6. *Colpomenia sinuosa* (Roth) Derb. et Sol. (1)
(Phaeophyta)

Bei dieser Alge treten neben den schon bekannten C_{20} -Fettsäuren in größerer Menge die höherungesättigten C_{18} -Fettsäuren ($C_{18}(3=)$ und $C_{18}(4=)$) auf.

Colpomenia sinuosa enthält die folgenden Fettsäuren:

$C_{16}(1=)$ und $C_{16}(2=)$
 $C_{18}(1=)$, $C_{18}(2=)$, $C_{18}(3=)$ und $C_{18}(4=)$
 $C_{20}(3=)$, $C_{20}(4=)$ und $C_{20}(5=)$

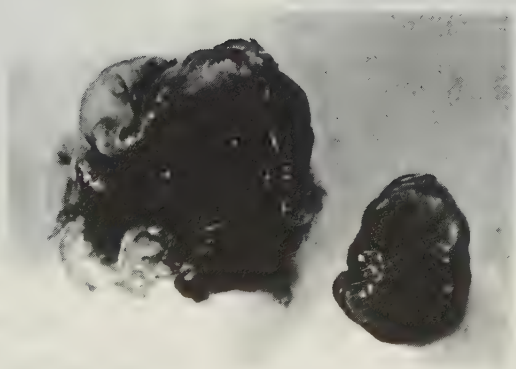


Abb. 30 : *Colpomenia sinuosa*

Colpomenia sinuosa (Roth) Derb. et Sol. (II)

(Phaeophyta)

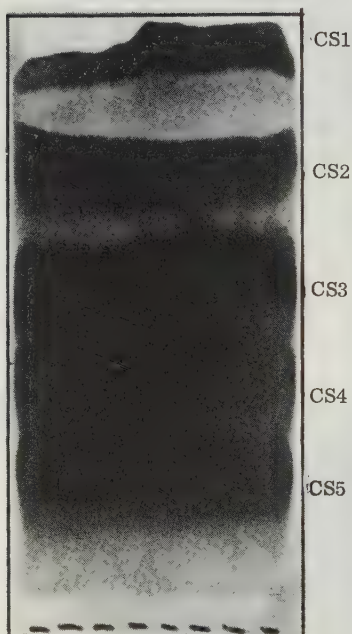


Abb. 31

DC der Hg-Add.

LM: IB / AS / W

(100 : 0,5 : 15,7)

Zone CS1: C₁₈(1=), C₁₆(1=),
C₁₈(2=), C₁₆(2=) u. C₂₀(3=)

Zone CS2: C₁₈(3=)

Zone CS3: C₂₀(4=)

Zone CS4: C₁₈(4=)

Zone CS5: C₂₀(5=)

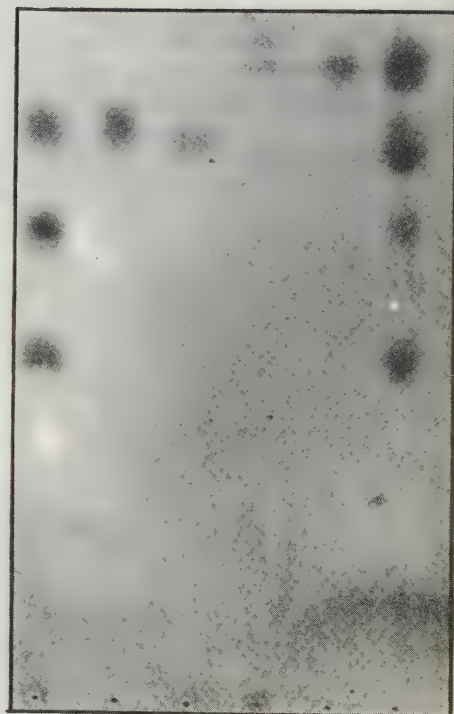


Abb. 32

DC der reg. Ester

LM: AS / AN / A

(2 : 2 : 1)

1: Test-Ester

2: CS2 = C₁₈(3=)

3: CS3 = C₂₀(4=)

4: CS4 = C₁₈(4=)

5: CS5 = C₂₀(5=)

6: Ungesättigte Ester von
Colpomenia sinuosa

Colpomenia sinuosa (Roth) Derb. et Sol. (III)

(Phaeophyta)

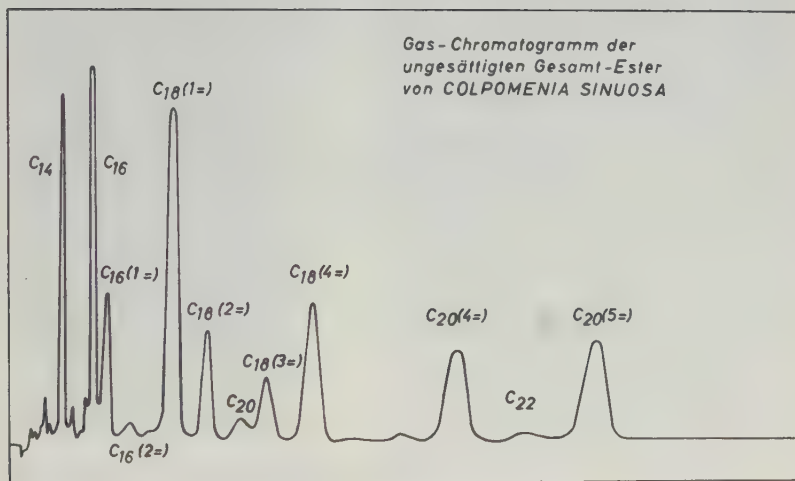


Abb. 33 : Gas-Chromatogramm der ungesättigten Ester

7. *Cutleria multifida* (Sm.) Grev. (I)

(Phaeophyta)

Die Zusammensetzung der ungesättigten Fettsäuren ist der von *Colpomenia sinuosa* sehr ähnlich. Dieses geht vor allem aus dem Dünnschichtchromatogramm der Hg-Add. und aus dem Gaschromatogramm hervor. Wieder treten die $C_{18}(3=)$ - und $C_{18}(4=)$ -Fettsäuren in größerer Menge auf, sodaß sie mengenmäßig etwa den $C_{20}(4=)$ - und $C_{20}(5=)$ -Fettsäuren entsprechen. Auch bei den regenerierten Estern ergibt sich praktisch dasselbe Bild.

Demnach ist die Fettsäurezusammensetzung:

$C_{16}(1=)$ und $C_{16}(2=)$
 $C_{18}(1=)$, $C_{18}(2=)$, $C_{18}(3=)$ und $C_{18}(4=)$
 $C_{20}(3=)$, $C_{20}(4=)$ und $C_{20}(5=)$

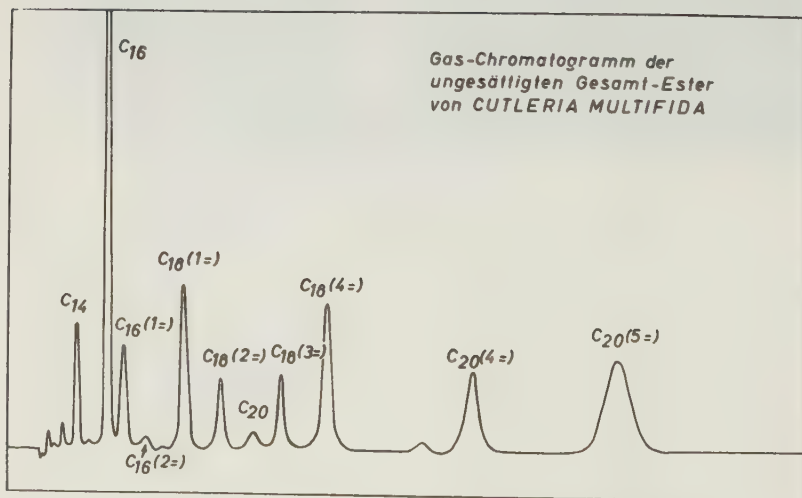


Abb. 34 : Gas-Chromatogramm der ungesättigten Ester

Cutleria multifida (Sm.) Grev. (II)

(Phaeophyta)

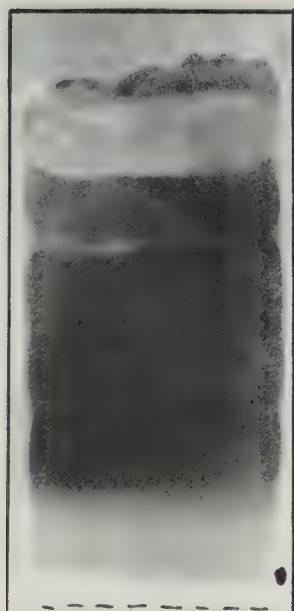


Abb. 35

DC der HG-Add.

LM: IB / AS / W

(100 : 0,5 : 15,7)

Zone CM1: $C_{18}(1=)$, $C_{16}(1=)$

$C_{18}(2=)$, $C_{16}(2=)$ u. $C_{20}(3=)$

Zone CM2: $C_{18}(3=)$

Zone CM3: $C_{20}(4=)$

Zone CM4: $C_{18}(4=)$

Zone CM5: $C_{20}(5=)$

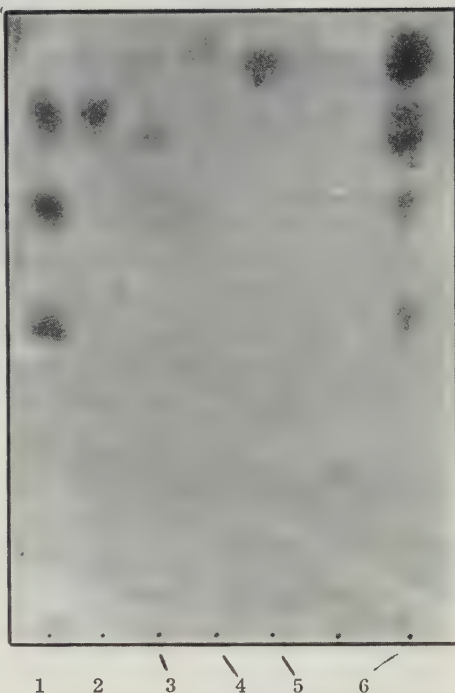


Abb. 36

DC der reg. Ester

LM: AS / AN / A

(2 : 2 : 1)

1: Test-Ester

2: CM2 = $C_{18}(3=)$

3: CM3 = $C_{20}(4=)$

4: CM4 = $C_{18}(4=)$

5: CM5 = $C_{20}(5=)$

6: Ungesättigte Ester von
Cutleria multifida

8. *Lessonia fusca* Bory (I)

(Phaeophyta)

Diese aus Chile stammende Alge stimmt gut mit den beiden vorangegangenen Braunalgen aus Neapel überein. Auch hier treten neben den C_{20} -Fettsäuren ($C_{20}(4=)$ und $C_{20}(5=)$) die beiden höherungesättigten C_{18} -Fettsäuren ($C_{18}(3=)$ und $C_{18}(4=)$) auf. Abb. 38 zeigt im Bereich der Zonen LF2 und LF4 deutlich den Unterschied zwischen *Lessonia* f. und der Rotalge *Porphyra columbina*, bei der bekanntlich diese Fettsäuren fehlen. In geringen Mengen findet sich auch die $C_{22}(4=)$ -, während die $C_{20}(3=)$ -Fettsäure völlig fehlt.

Dementsprechend hat *Lessonia fusca* folgende Fettsäurezusammensetzung:

$C_{16}(1=)$ und $C_{16}(2=)$
 $C_{18}(1=)$, $C_{18}(2=)$, $C_{18}(3=)$ und $C_{18}(4=)$
 $C_{20}(4=)$ und $C_{20}(5=)$
 $C_{22}(4=)$ (nur sehr wenig)

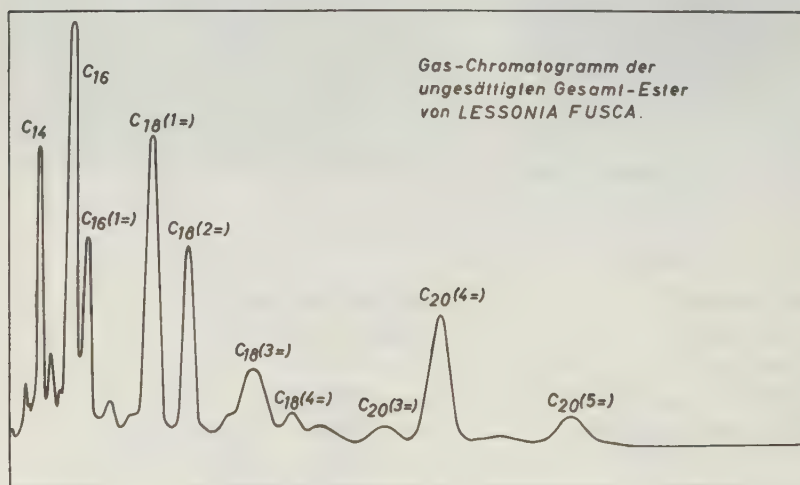


Abb. 37 : Gas-Chromatogramm der ungesättigten Ester

Lessonia fusca Bory (II)

(Phaeophyta)

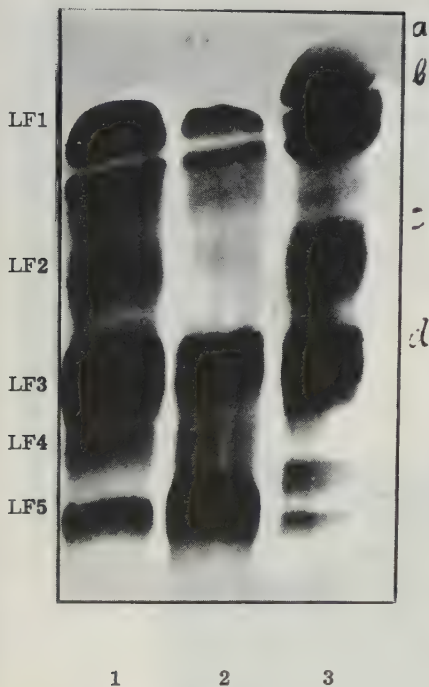


Abb. 38

DC der Hg-Add.

LM: IB / AS / W

(100 : 0,5 : 15,7)

1: Addukte von *Lessonia fusca*

2: Addukte von *Porphyra columbina*

3: Mischung der Test-Addukte

(a=C₁₈(1=), b=C₁₈(2=),

c = C₁₈(3=), d = C₂₀(4=))

Zone LF1: C₁₈(1=), C₁₆(1=),
C₁₈(2=), C₁₆(2=) u. C₂₀(3=)

Zone LF2: C₁₈(3=)

Zone LF3: C₂₀(4=)

Zone LF4: C₁₈(4=)

Zone LF5: C₂₀(5=)

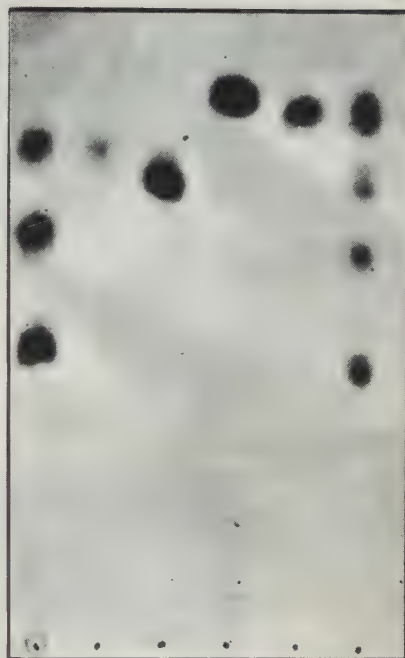


Abb. 39

DC der reg. Ester

LM: AS / AN / A

(2 : 2 : 1)

1: Test-Ester

2: LF2 = C₁₈(3=)

3: LF3 = C₂₀(4=)

4: LF4 = C₁₈(4=)

5: LF5 = C₂₀(5=)

6: Ungesättigte Ester von
Lessonia fusca

9. *Padina pavonia* (L.) Lamour. (I)

(Phaeophyta)

Diese im Mittelmeer sehr häufig anzureichende Braunalge besitzt nahezu die gleichen Fettsäuren wie die vorangegangenen. Dies geht anschaulich aus dem Chromatogramm in Abb. 41 hervor, in dem die Addukte von *Padina p.* und von *Colpomenia sinuosa* nebeneinander aufgetrennt erscheinen.

Die Fettsäuren von *Padina pavonia* sind also:

$C_{16}(1=)$ und $C_{16}(2=)$
 $C_{18}(1=)$, $C_{18}(2=)$, $C_{18}(3=)$ und $C_{18}(4=)$
 $C_{20}(3=)$, $C_{20}(4=)$ und $C_{20}(5=)$



Abb. 40 : *Padina pavonia*

Padina pavonia (L.) Lamour. (II)

(Phaeophyta)

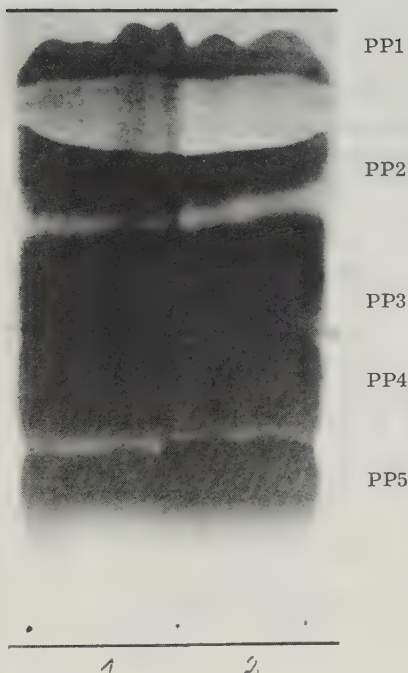


Abb. 41

DC der Hg-Add.

LM: IB / AS / W

(100 : 0,5 : 15,7)

- 1: Addukte von Padina pavonia
2: Addukte von Colpomenia sinuosa

Zone PP1: $C_{18}(1=)$, $C_{16}(1=)$, $C_{18}(2=)$, $C_{16}(2=)$ u. $C_{20}(3=)$

Zone PP2: $C_{18}(3=)$

Zone PP3: $C_{20}(4=)$

Zone PP4: $C_{18}(4=)$

Zone PP5: $C_{20}(5=)$

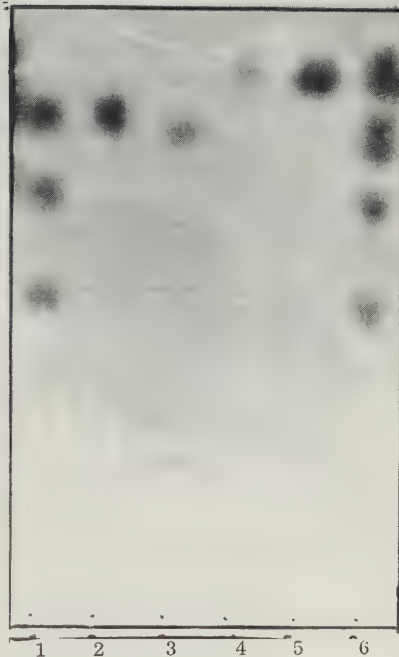


Abb. 42

DC der reg. Ester

LM: AS / AN / A

(2 : 2 : 1)

- 1: Test-Ester
2: PP2 = $C_{18}(3=)$
3: PP3 = $C_{20}(4=)$
4: PP4 = $C_{18}(4=)$
5: PP5 = $C_{20}(5=)$
6: Ungesättigte Ester von Padina pavonia

Padina pavonia (L.) Lamour. (III)

(Phaeophyta)

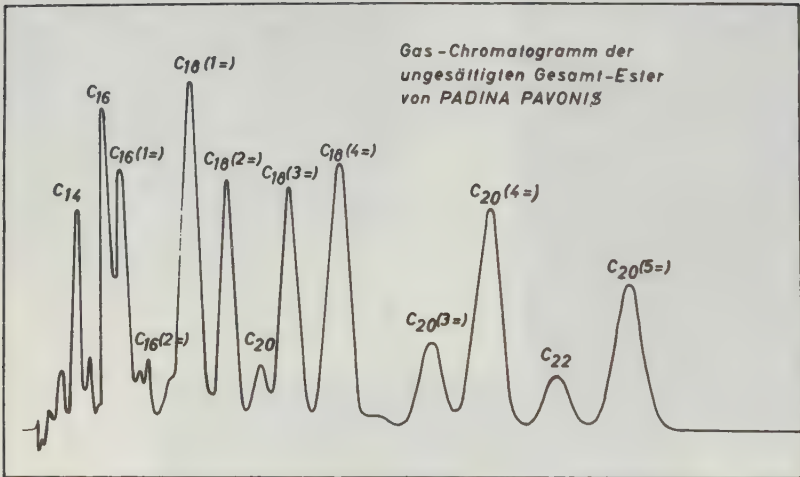


Abb. 43 : Gas-Chromatogramm der ungesättigten Ester

10. *Sargassum linifolium* (Thurn.) J. Ag. (I)
(Phaeophyta)

Für diese Alge wurde fast die gleiche Fettsäurezusammensetzung wie bei den anderen Braunalgen ermittelt ^{x)}.

Sie ist demnach:

$C_{16}(1=)$ und $C_{16}(2=)$
 $C_{18}(1=)$, $C_{18}(2=)$, $C_{18}(3=)$ und $C_{18}(4=)$
 $C_{20}(3=)$, $C_{20}(4=)$ und $C_{20}(5=)$

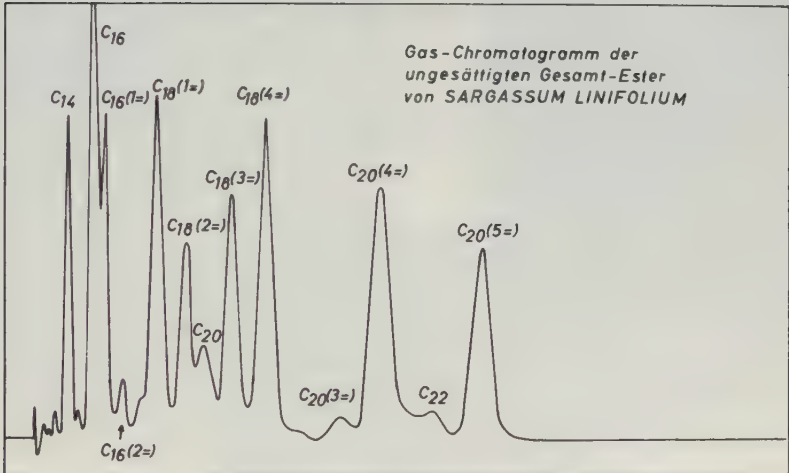


Abb. 44 Gas-Chromatogramm der ungesättigten Ester

x) Bei *Sargassum* 1. tritt eine Fettsäure auf, die bisher noch nicht identifiziert werden konnte. Der RF-Wert des Quecksilberaddukts dieser Fettsäure (Abb. 45, Zone SL6) liegt unter denen aller anderen Addukte und würde demnach auf eine langkettige und hochungesättigte Fettsäure hinweisen, jedoch fällt der RF-Wert des regenerierten Esters (Abb. 46, Nr. 6) völlig aus dem Rahmen. Das Gas-Chromatogramm gibt keinen näheren Hinweis. Auf Grund von vorläufigen Untersuchungen (131) könnte es sich um eine ungesättigte Hydroxyfettsäure handeln.

Sargassum linifolium (Thurn.) J. Ag. (II)

(Phaeophyta)

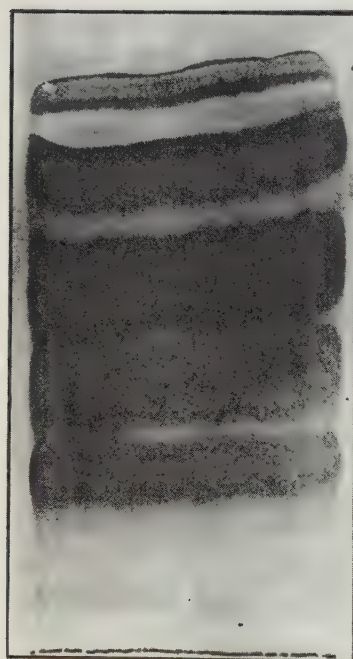


Abb. 45

DC der Hg-Add.

LM: IB / AS / W
(100 : 0,5 : 15,7)

Zone SL1: C₁₈(1=), C₁₆(1=),
C₁₈(2=), C₁₆(2=) u. C₂₀(3=)

Zone SL2: C₁₈(3=)

Zone SL3: C₂₀(4=)

Zone SL4: C₁₈(4=)

Zone SL5: C₂₀(5=)

Zone SL6: ?

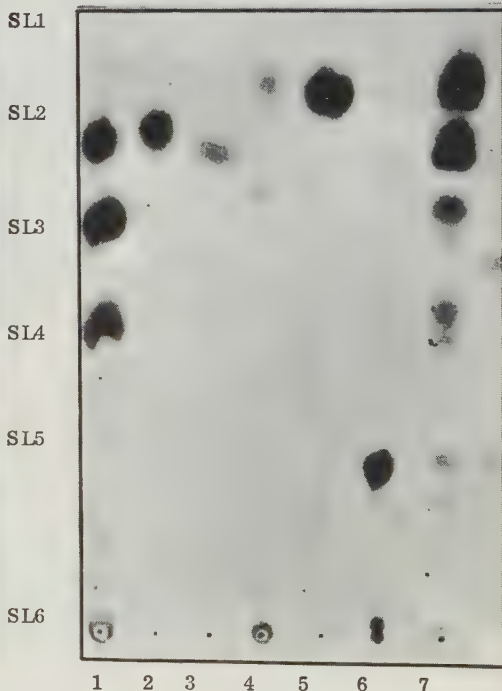


Abb. 46

DC der reg. Ester

LM: AS / AN / A
(2 : 2 : 1)

1: Test-Ester

2: SL2 = C₁₈(3=)

3: SL3 = C₂₀(4=)

4: SL4 = C₁₈(4=)

5: SL5 = C₂₀(5=)

6: SL6 = ?

7: Ungesättigte Ester von
Sargassum linifolium

11. *Codium Stackhouse* (I)

12. *Codium elongatum* Ag. (I)

(Chlorophyta)

Diese beiden aus Chile bzw. Neapel stammenden Arten stimmen in ihrer Fettsäurezusammensetzung praktisch überein. Wie fast alle bisher besprochenen Algen besitzen auch sie die Fettsäuren $C_{16}(1=)$, $C_{16}(2=)$, $C_{18}(1=)$, $C_{18}(2=)$ und $C_{20}(3=)$.

Neben den bisher bei den Rot- und Braunalgen gefundenen höherungesättigten Fettsäuren ($C_{18}(3=)$, $C_{18}(4=)$, $C_{20}(4=)$ und $C_{20}(5=)$) findet sich hier, wie in Abb. 48 und 50 (Zone CSt3 bzw. CE3) gut zu erkennen ist, erstmals eine $C_{16}(3=)$ -Fettsäure.

Alle zuletzt genannten höherungesättigten Fettsäuren treten, wie aus Abb. 48 und 50 erkennbar ist, etwa in gleichen Anteilen auf.

Die Fettsäurezusammensetzung ist bei beiden Arten:

$-C_{16}(1=)$, $C_{16}(2=)$ und $C_{16}(3=)$
 $C_{18}(1=)$, $C_{18}(2=)$, $C_{18}(3=)$ und $C_{18}(4=)$
 $C_{20}(3=)$, $C_{20}(4=)$ und $C_{20}(5=)$

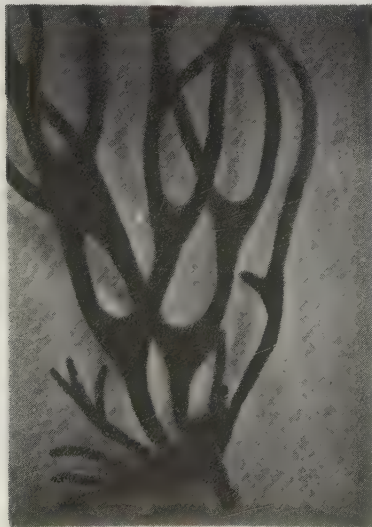


Abb. 47 : *Codium elongatum*

Codium Stackhouse (II)

(Chlorophyta)

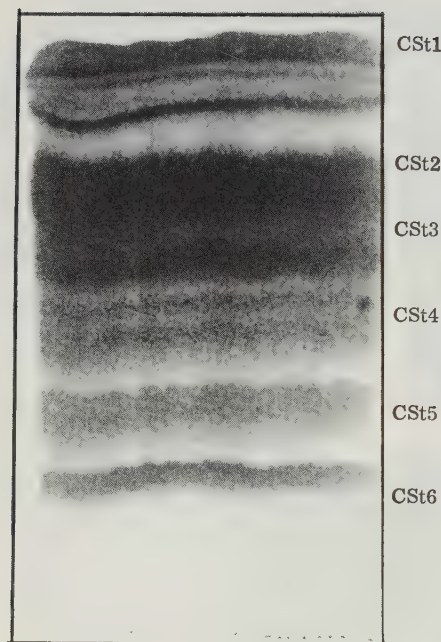


Abb. 48

DC der Hg-Add.

LM: IB / AS / W
(100 : 0,5 : 15,7)

- Zone CSt1: $C_{18}(1=)$, $C_{16}(1=)$,
 $C_{18}(2=)$, $C_{16}(2=)$ u. $C_{20}(3=)$
Zone CSt2: $C_{18}(3=)$
Zone CSt3: $C_{16}(3=)$
Zone CSt4: $C_{20}(4=)$
Zone CSt5: $C_{18}(4=)$
Zone CSt6: $C_{20}(5=)$

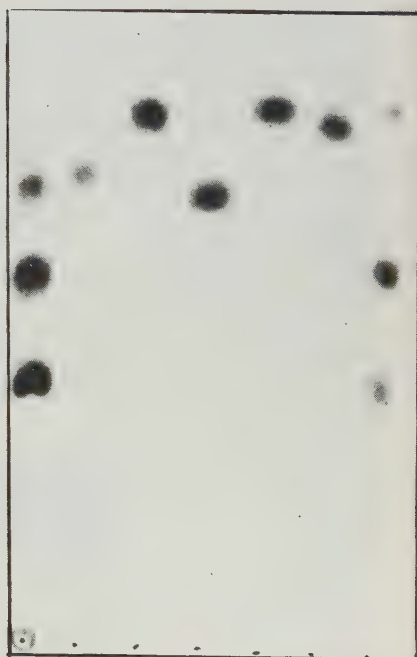


Abb. 49

DC der reg. Ester

LM: AS / AN / A
(2 : 2 : 1)

- 1: Test-Ester
2: CSt2 = $C_{18}(3=)$
3: CSt3 = $C_{16}(3=)$
4: CSt4 = $C_{20}(4=)$
5: CSt5 = $C_{18}(4=)$
6: CSt6 = $C_{20}(5=)$
7: Ungesättigte Ester von
Codium Stackhouse

Codium elongatum Ag. (II)
(Chlorophyta)



Abb. 50

DC der Hg-Add.

LM: IB / AS / W
(100 : 0,5 : 15,7)

Zone CE1: C₁₈(1=), C₁₆(1=),

C₁₈(2=) und C₁₆(2=)

Zone CE2: C₂₀(3=)

Zone CE3: C₁₈(3=)

Zone CE4: C₁₆(3=)

Zone CE5: C₂₀(4=)

Zone CE6: C₁₈(4=)

Zone CE7: C₂₀(5=)

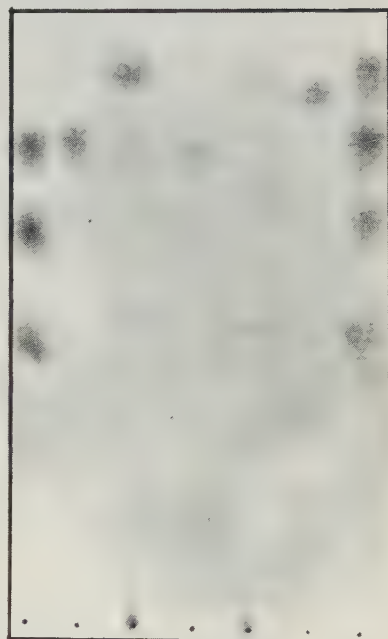


Abb. 51

DC der reg. Ester

LM: AS / AN / A
(2 : 2 : 1)

1: Test-Ester

2: CE3 = C₁₈(3=)

3: CE4 = C₁₆(3=)

4: CE5 = C₂₀(4=)

5: CE6 = C₁₈(4=)

6: CE7 = C₂₀(5=)

7: Ungesättigte Ester von
Codium elongatum

Codium Stackhouse (III)
und Codium elongatum Ag. (Chlorophyta)

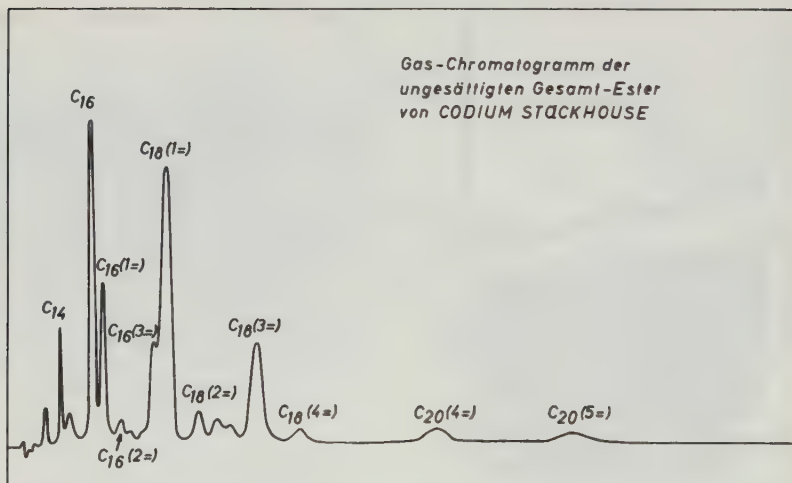


Abb. 52 : Gas-Chromatogramm der ungesättigten Ester von Codium Stackhouse

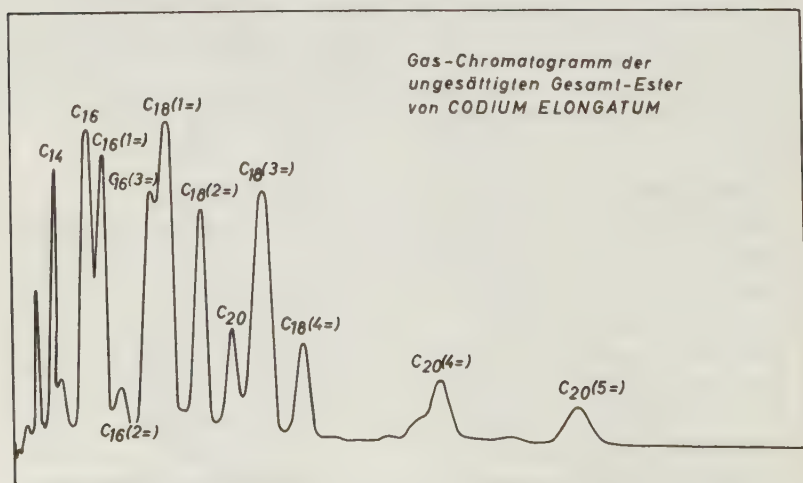


Abb. 53 : Gas-Chromatogramm der ungesättigten Ester von Codium elongatum

13. *Halimeda Tuna* (Ellis et Solander) Lamour. (I)

(Chlorophyta)

Bei dieser Alge findet sich ebenfalls neben den schon bekannten höher- ungesättigten C_{18} - und C_{20} -Fettsäuren die $C_{16}(3=)$ -Fettsäure. Besonders zu beachten ist bei *Halimeda Tuna* das Auftreten einer $C_{22}(6=)$ -Fettsäure, deren Addukt in Abb. 55 (Zone HT7) gut zu sehen ist.

Bei den Adduktzonen HT2 - HT6 der Abb. 55 fällt auf, daß diese jeweils in weitere schmale Zonen unterteilt sind. Eine ähnliche Beobachtung konnten wir auch bei den anderen Algen machen, doch gelang es dort nicht, diese Unterteilung photographisch wiederzugeben. Die Frage, ob es sich dabei um Isomere der betreffenden Fettsäuren handelt, konnten wir bis heute weder mit Hilfe der regenerierten Ester noch durch die Gas-Chromatographie klären.

Halimeda Tuna enthält folgende ungesättigten Fettsäuren:

$C_{16}(1=)$, $C_{16}(2=)$ und $C_{16}(3=)$
 $C_{18}(1=)$, $C_{18}(2=)$, $C_{18}(3=)$ und $C_{18}(4=)$
 $C_{20}(3=)$, $C_{20}(4=)$ und $C_{20}(5=)$
 $C_{22}(6=)$



Abb. 54 *Halimeda Tuna*

Halimeda Tuna (Ellis et Solander) Lamour. (II)

(Chlorophyta)

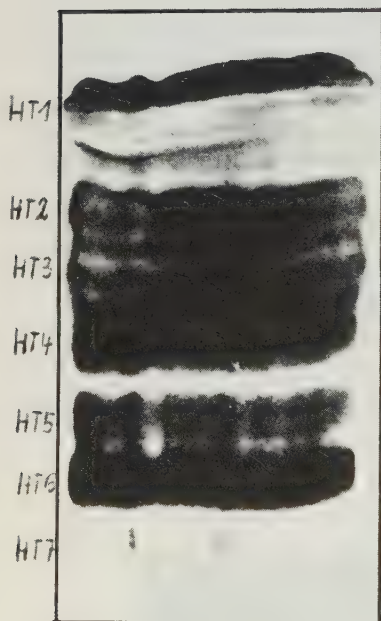


Abb. 55

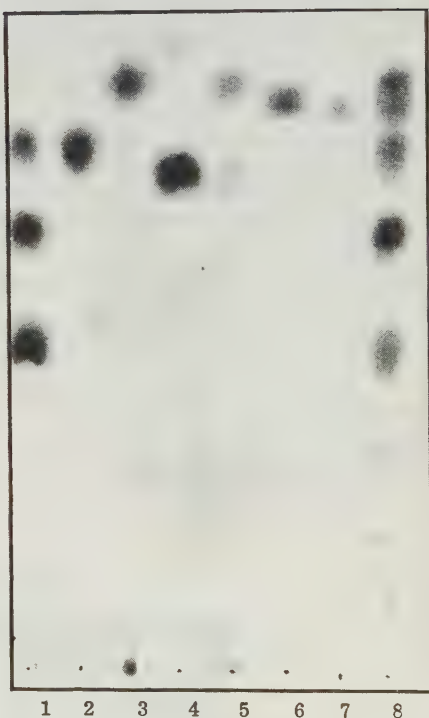


Abb. 56

DC der Hg-Add.

LM: IB / AS / W

(100 : 0,5 : 15,7)

Zone HT1: C₁₈(1=), C₁₆(1=),
C₁₈(2=), C₁₆(2=) u. C₂₀(3=)

Zone HT2: C₁₈(3=)

Zone HT3: C₁₆(3=)

Zone HT4: C₂₀(4=)

Zone HT5: C₁₈(4=)

Zone HT6: C₂₀(5=)

Zone HT7: C₂₂(6=)

DC der reg. Ester

LM: AS / AN / A

(2 : 2 : 1)

1: Test-Ester

2: HT2 = C₁₈(3=)

3: HT3 = C₁₆(3=)

4: HT4 = C₂₀(4=)

5: HT5 = C₁₈(4=)

6: HT6 = C₂₀(5=)

7: HT7 = C₂₂(6=)

8: Ungesättigte Ester von
Halimeda Tuna

Halimeda Tuna (Ellis et Solander) Lamour. (III)

(Chlorophyta)

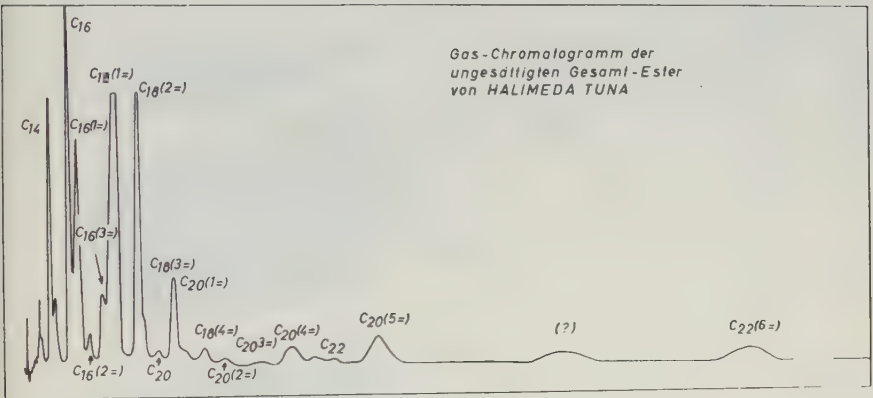


Abb. 57 : Gas-Chromatogramm der ungesättigten Ester

14. *Udotea petiolata* (Trev.) Boerg. (I)

(Chlorophyta)

Diese Alge ist ebenfalls durch die in relativ großer Menge vorliegende $C_{16}(3=)$ -Fettsäure charakterisiert (Abb. 59, Zone UP4). Die $C_{18}(4=)$ -Fettsäure ist relativ schwach vertreten (Zone UP6). Darüberhinaus sind mit Ausnahme der $C_{22}(6=)$ alle bisher bei den vorangegangenen Chlorophyta gefundenen Fettsäuren vorhanden.

Die Zusammensetzung der ungesättigten Fettsäuren ist also folgende:

$C_{16}(1=)$, $C_{16}(2=)$ und $C_{16}(3=)$
 $C_{18}(1=)$, $C_{18}(2=)$, $C_{18}(3=)$ und $C_{18}(4=)$
 $C_{20}(3=)$, $C_{20}(4=)$ und $C_{20}(5=)$



Abb. 58 : *Udotea petiolata*

Udotea petiolata (Trev.) Boerg. (II)
(Chlorophyta)

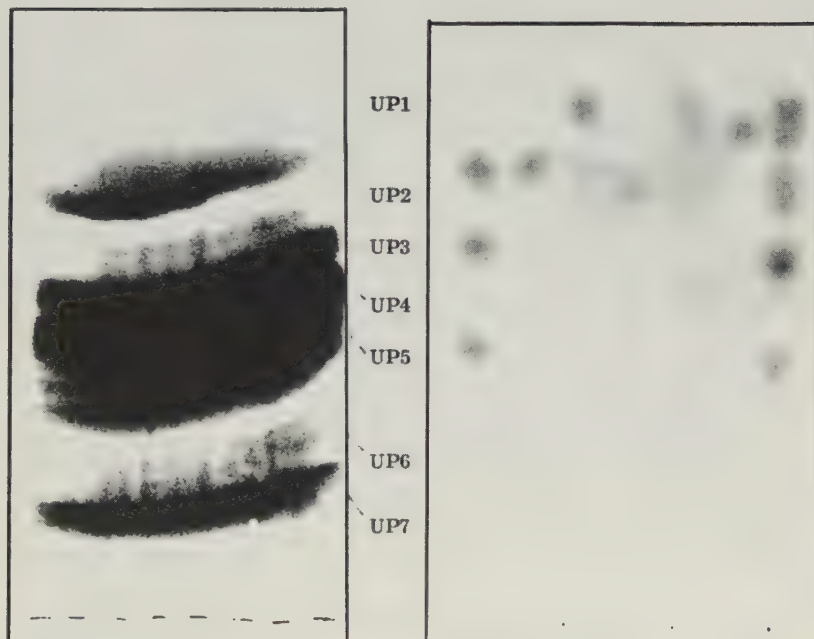


Abb. 59

Abb. 60

DSC der Hg-Add.

LM: IB / AS / W
(100 : 0,5 : 15,7)

Zone UP1: C₁₈(1=), C₁₆(1=),
C₁₈(2=) und C₁₆(2=)

Zone UP2: C₂₀(3=)

Zone UP3: C₁₈(3=)

Zone UP4: C₁₆(3=)

Zone UP5: C₂₀(4=)

Zone UP6: C₁₈(4=)

Zone UP7: C₂₀(5=)

DSC der reg. Ester

LM: AS / AN / A
(2 : 2 : 1)

1: Test-Ester

2: UP3 = C₁₈(3=)

3: UP4 = C₁₆(3=)

4: UP5 = C₂₀(4=)

5: UP6 = C₁₈(4=)

6: UP7 = C₂₀(5=)

7: Ungesättigte Ester von
Udotea petiolata

Udotea petiolata (Trev.) Boerg. (III)

(Chlorophyta)

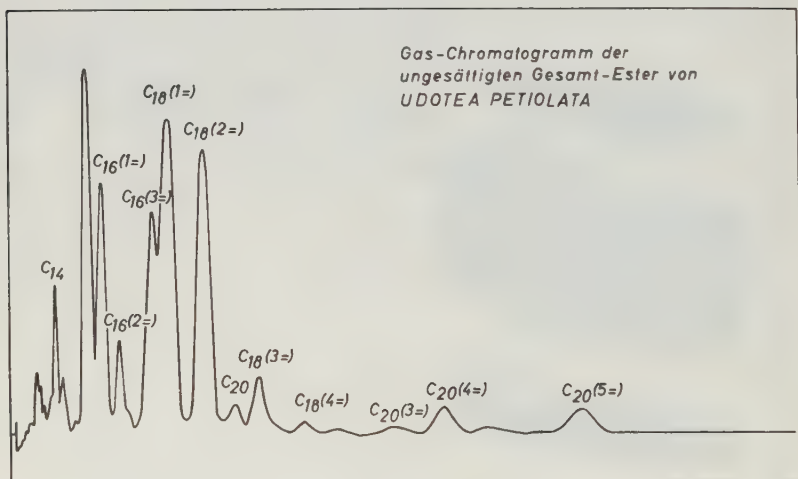


Abb. 61 : Gas-Chromatogramm der ungesättigten Ester

15. *Ulva fasciata* Delile (I)

16. *Ulva lactuca* L. (I)

(Chlorophyta)

Beide Algen stimmen in ihren Fettsäuren völlig überein. Ihre Fettsäurezusammensetzung weicht aber in bemerkenswerter Weise von der der anderen Chlorophyta ab:

Wie am besten aus dem Chromatogrammbild der regenerierten Einzelester (Abb. 65, Nr. 6; bzw. Abb. 67, Nr. 5) sowie aus den Abb. 12 und 13 S. 31) ersichtlich ist, tritt bei beiden die relativ seltene $C_{16}(4=)$ -Fettsäure auf, die als einzige Fettsäure wegen ihres hohen RF-Wertes bereits bei der Dünnschichtchromatographie der ungesättigten Gesamt-Fettsäuren bzw. Gesamt-Ester zu erkennen ist (s. Abb. 12 und 13, vergl. auch Abb. 8).

Zusätzlich findet sich in geringer Menge erstmalig auch die $C_{22}(5=)$ -Fettsäure, sodaß hier der seltene Fall eines Kritischen Addukt-Paares ($C_{16}(4=)$ und $C_{22}(5=)$) auftritt. Das Vorliegen dieses Paares ist in Abb. 65 (Nr. 6) daran zu erkennen, daß hier aus einer Adduktzone zwei Ester regeneriert wurden, deren RF-Werte um zwei RF-Einheiten auseinanderliegen.

Wegen dieses Kritischen Addukt-Paares war es schwierig, die Auftrennung der Addukte (Abb. 64) photographisch deutlich wiederzugeben. Im Bereich der Zonen UF5 und UF6 befinden sich nämlich die Addukte der drei Fettsäuren $C_{18}(4=)$, $C_{16}(4=)$ und $C_{22}(5=)$.

Somit ergibt sich für beide Algen folgende übereinstimmende Fettsäurezusammensetzung:

$C_{16}(1=)$, $C_{16}(2=)$, $C_{16}(3=)$ und $C_{16}(4=)$
 $C_{18}(1=)$, $C_{18}(2=)$, $C_{18}(3=)$ und $C_{18}(4=)$
 $C_{20}(3=)$ und $C_{20}(4=)$
 $C_{22}(5=)$ (wenig)

Ulva fasciata Delile (II)

Ulva lactuca L. (II)



Abb. 62 : *Ulva fasciata*

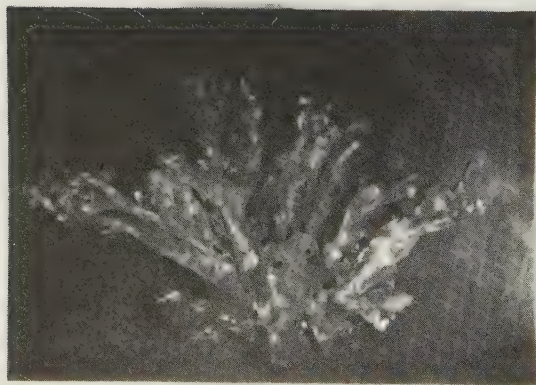


Abb. 63 : *Ulva lactuca*

Ulva fasciata Delile (III)

(Chlorophyta)



Abb. 64

DC der Hg-Add.

LM: IB / AS / W
(100 : 0, 5 : 15, 7)

Zone UF1: $C_{18}(1=)$, $C_{16}(1=)$,

$C_{18}(2=)$, $C_{16}(2=)$ u. $C_{20}(3=)$

Zone UF2: $C_{18}(3=)$

Zone UF3: $C_{16}(3=)$ (wenig)

Zone UF4: $C_{20}(4=)$ (")

Zone UF5: $C_{18}(4=)$

Zone UF6: $C_{16}(4=)$ u. $C_{22}(5=)$

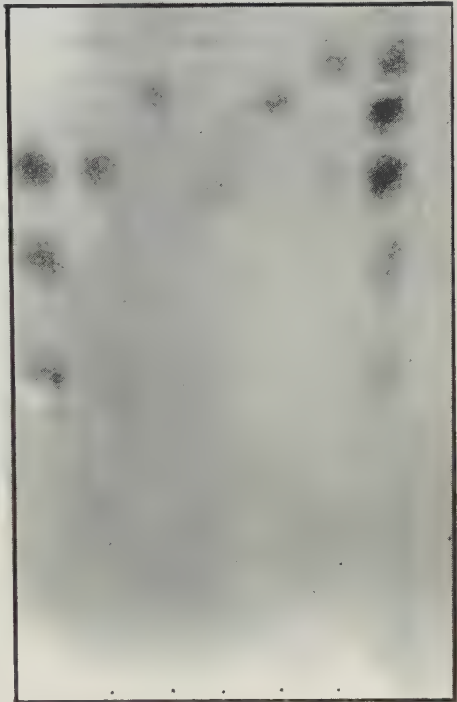


Abb. 65

DC der reg. Ester

LM: AS / AN / A
(2 : 2 : 1)

1: Test-Ester

2: UF2 = $C_{18}(3=)$

3: UF3 = $C_{16}(3=)$

4: UF4 = $C_{20}(4=)$

5: UF5 = $C_{18}(4=)$

6: UF6 = $C_{16}(4=)$ u. $C_{22}(5=)$

7: Ungesättigte F.S.-Ester von
Ulva fasciata

Ulva lactuca L. (III)

(Chlorophyta)



Abb. 66

DC der Hg-Add.

LM: IB / AS / W
(100 : 0,5 : 15,7)

Zone UL1: C₁₈(1=), C₁₆(1=),
C₁₈(2=), C₁₆(2=) u. C₂₀(3=)

Zone UL2: C₁₈(3=)

Zone UL3: C₂₀(4=)

Zone UL4: C₁₈(4=)

Zone UL5: C₁₆(4=) u. C₂₂(5=)

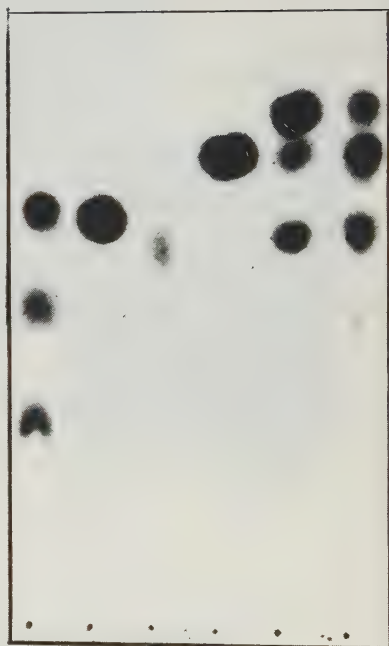


Abb. 67

DSC der reg. Ester

LM: AS / AN / A
(2 : 2 : 1)

1: Test-Ester

2: UL2 = C₁₈(3=)

3: UL3 = C₂₀(4=)

4: UL4 = C₁₈(4=)

5: UL5 = C₁₆(4=) u. C₂₂(5=)

6: Ungesättigte Ester von Ulva
lactuca.

Ulva fasciata Delile (IV)
und Ulva lactuca L. (IV) (Chlorophyta)

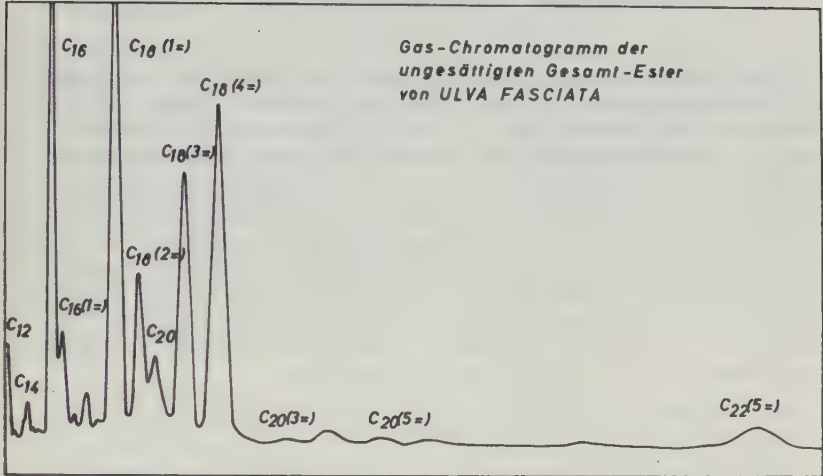


Abb. 68 : Gas-Chromatogramm der ungesättigten Ester von *Ulva fasciata*

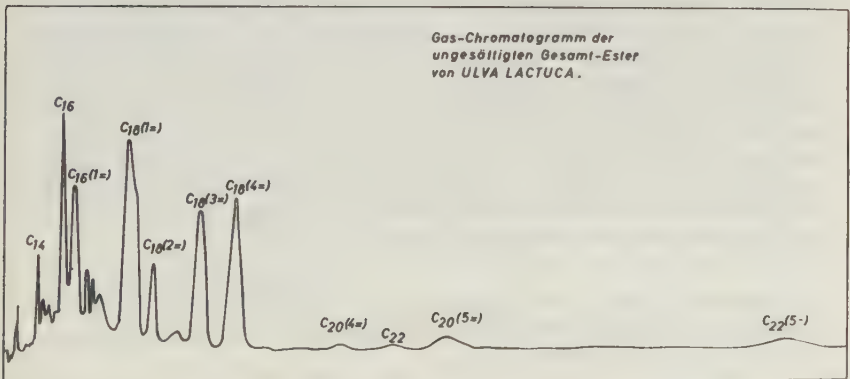


Abb. 69 : Gas-Chromatogramm der ungesättigten Ester von *Ulva lactuca*

F) ERGEBNISSE UND DISKUSSION

1. Vergleich der drei Algen-Stämme

Wie in Tab. 5 zusammenfassend dargestellt ist, scheint für die Rhodophyta das Überwiegen der C_{20} -Fettsäuren, vor allem der $C_{20}(4=)$ -, und das Fehlen der höherungesättigten C_{16} - und C_{18} -Fettsäuren charakteristisch zu sein. Hinsichtlich der $C_{20}(4=)$ -Fettsäure gilt dies in besonderem Maße für *Gracilaria confervoides* (Abb. 19, 20, 21) und *Sebdenia Monardiana* (Abb. 27, 29). Bei *Porphyra columbina* (Abb. 23 u. 24) erscheinen neben der $C_{20}(4=)$ - noch die $C_{20}(3=)$ - und $C_{20}(5=)$ -Fettsäuren. Eine Ausnahme macht *Gigartina Teedii* (Abb. 14, 16), bei der wir vor allem die $C_{18}(1=)$ -Fettsäure fanden. Alle anderen C_{18} - und C_{20} -Fettsäuren waren bei dieser nur sehr schwach vertreten. Bei der fertilen und sterilen Form von *Gracilaria confervoides* (Abb. 21) konnten wir keinen Unterschied in der Zusammensetzung der ungesättigten Fettsäuren feststellen.

Alle 5 Vertreter der Phaeophyta sind durch eine besonders einheitliche Fettsäurezusammensetzung gekennzeichnet (Abb. 11, 31, 35, 41, 45). Die-
se ist: $C_{16}(1=)$ und $C_{16}(2=)$, $C_{18}(1=)$ bis $C_{18}(4=)$ und $C_{20}(3=)$ bis $C_{20}(5=)$.

Gegenüber den Rhodophyta treten also zusätzlich vor allem die $C_{18}(3=)$ - und die $C_{18}(4=)$ -Fettsäure auf. Der Gehalt an der $C_{20}(4=)$ -Fettsäure ist vermindert, während der Gehalt an der $C_{20}(5=)$ -Fettsäure erhöht ist, sodaß beide Fettsäuren etwa in gleichen Mengen vorhanden sind. Lediglich bei *Lessonia fusca* fanden wir in geringer Konzentration noch eine $C_{22}(4=)$ -Fettsäure.

Bei dem Stamm der Chlorophyta findet sich als Charakteristicum vor allem die $C_{16}(3=)$ -Fettsäure (Abb. 48, 50, 55, 59, 64, 66). Vereinzelt treten anderweitig nur selten vorkommende höherungesättigte Fettsäuren auf. So enthalten die beiden *Ulva*-Arten (Abb. 65, 67) eine $C_{22}(5=)$ - und daneben noch eine $C_{16}(4=)$ -Fettsäure, die vermutlich mit der von KLENK in den Grünalgen *Scenedesmus obliquus* (128, 129) und *Enteromorpha compressa* (28) gefundenen 4, 7, 10, 13- $C_{16}(4=)$ -Fettsäure übereinstimmt. Eine andere sonst selten vorkommende Fettsäure ist die in *Halimeda Tuna* auftretende $C_{22}(6=)$ -Fettsäure (Abb. 56). Sie ist bisher noch nicht aus Algen isoliert worden, ist jedoch ein bekannter Bestandteil tierischer Lipide.

Bei einem Vergleich der drei Algenstämme untereinander zeigt sich in der Reihenfolge Rhodophyta-Phaeophyta-Chlorophyta bei jeder Kettenlänge eine Zunahme der Doppelbindungszahl.

So findet man in der C_{16} -Fettsäurereihe bei den Rhodophyta und Phaeophyta die $C_{16}(1=)$ - und $C_{16}(2=)$ -, bei den Chlorophyta zusätzlich noch die $C_{16}(3=)$ - und sogar vereinzelt die $C_{16}(4=)$ -Fettsäure. Diese $C_{16}(4=)$ -Fettsäure stellt die am höchsten ungesättigte C_{16} -Fettsäure dar, die bisher in der Natur gefunden wurde.

In der C_{18} -Fettsäurereihe finden sich bei den Rhodophyta vor allem die $C_{18}(1=)$ und $C_{18}(2=)$, und nur vereinzelt und in geringen Mengen die $C_{18}(3=)$ und die $C_{18}(4=)$ -Fettsäure. Die $C_{18}(4=)$ -Fettsäure tritt hingegen bei allen Phaeophyta und Chlorophyta, und zwar in größerer Menge auf. Sie ist die am höchsten ungesättigte C_{18} -Fettsäure, die man bisher kennt.

In der C_{20} -Fettsäurereihe trifft man bei den Rhodophyta vor allem die $C_{20}(4=)$, weniger die $C_{20}(3=)$ und die $C_{20}(5=)$ -Fettsäure an. Bei den Phaeophyta dagegen ist die $C_{20}(5=)$ -Fettsäure regelmäßig und in größerer Menge vertreten. Dasselbe gilt mit Ausnahme von *Ulva fasciata* und *Ulva lactuca*, bei denen sich statt der $C_{20}(5=)$ - die $C_{22}(5=)$ -Fettsäure findet, auch für die Chlorophyta. Die $C_{20}(5=)$ -Fettsäure ist die höchstungesättigte natürlich vorkommende C_{20} -Fettsäure.

Die C_{22} -Fettsäuren sind fast nur auf die Chlorophyta beschränkt. Lediglich bei *Lessonia fusca* (Phaeophyta) wurde in geringen Mengen eine $C_{22}(4=)$ -Fettsäure festgestellt. Die am höchsten ungesättigte C_{22} -Fettsäure, die bisher gefunden wurde, die $C_{22}(6=)$, erscheint gleichfalls nur bei den Chlorophyta.

Somit werden nur im Stamm der Chlorophyta in jeder Fettsäure-Reihe die jeweils höchstungesättigten Fettsäuren gebildet, nämlich die $C_{16}(4=)$ -, $C_{18}(4=)$ -, $C_{20}(5=)$ - und die $C_{22}(6=)$ -Fettsäuren. Allerdings sind diese Fettsäuren auf verschiedene Algen verteilt.

Bei der Betrachtung dieser Zusammenhänge zwischen den drei untersuchten Algenstämmen ist aber daraufhinzuweisen, daß diese Stämme entwicklungsgeschichtlich nicht miteinander verwandt sind, sondern sich höchstwahrscheinlich aus den Phytoflagellaten getrennt voneinander entwickelt haben. Wenn wir die Art der jeweils gebildeten ungesättigten Fettsäuren als ein wichtiges Kriterium für die erreichte Entwicklungsstufe ansehen dürfen, so können wir folgern, daß sich von den drei untersuchten Stämmen die Rhodophyta am wenigsten und die Chlorophyta am höchsten entwickelt haben. Die Phaeophyta würden demnach zwischen beiden eine gewisse Mittelstellung einnehmen.

In der nachfolgenden Tabelle 5 sind die Ergebnisse unserer Algen-Untersuchungen zusammengefaßt.

Tab. 5 : Qualitative Zusammensetzung der ungesättigten Fettsäuren
bei den untersuchten Algen

Alge	C ₁₆	C ₁₈	C ₂₀	C ₂₂
<u>(Rhodophyta)</u>				
Gigartina Teedii (Roth) Lamour.	1, 2=	1, 2, 3, 4= (-)	3, 4, 5= (-)	-----
Gracilaria confer- voides (L.) Grev. (fertil)	1, 2=	1, 2=	3, 4=	-----
Gracilaria confer- voides (L.) Grev. (steril)	1, 2=	1, 2=	3, 4=	-----
Porphyra columbina Agardh	1, 2=	1, 2=	3, 4, 5=	-----
Sebdenia Monardiana (Mont.) Berth.	1=	1, 2, 3= (-)	4, 5=	-----
<u>(Phaeophyta)</u>				
Colpomenia sinuosa (Roth) Derb. et Sol.	1, 2=	1, 2, 3, 4=	3, 4, 5=	-----
Cutleria multifida (Sm.) Grev.	1, 2=	1, 2, 3, 4=	3, 4, 5=	-----
Lessonia fusca Bory	1, 2=	1, 2, 3, 4=	4, 5=	4= (-)
Padina pavonia (L.) Lamour.	1, 2=	1, 2, 3, 4=	3, 4, 5=	-----
Sargassum linifolium (Thurn.) J. Ag.	1, 2=	1, 2, 3, 4=	3, 4, 5=	-----
<u>(Chlorophyta)</u>				
Codium Stackhouse	1, 2, 3=	1, 2, 3, 4=	3, 4, 5=	-----
Codium elongatum Ag.	1, 2, 3=	1, 2, 3, 4=	3, 4, 5=	-----
Halimeda Tuna (Ellis et Solander) Lamour.	1, 2, 3=	1, 2, 3, 4=	3, 4, 5=	6=
Udotea petiolata (Trev.) Boerg.	1, 2, 3=	1, 2, 3, 4=	3, 4, 5=	-----
Ulva fasciata Delile	1, 2, 3, 4=	1, 2, 3, 4=	3, 4=	5=
Ulva lactuca L.	1, 2, 3, 4=	1, 2, 3, 4=	3, 4=	5=

(-) : In geringer Menge

2. Mögliche taxonomische Bedeutung der von uns untersuchten ungesättigten Fettsäuren

Ein Blick auf die Tabelle der gefundenen ungesättigten Fettsäuren zeigt, daß die meisten von ihnen ($C_{16}(1=)$, $C_{16}(2=)$, $C_{18}(1=)$, $C_{18}(2=)$, $C_{18}(3=)$, $C_{18}(4=)$, $C_{20}(3=)$, $C_{20}(4=)$ und $C_{20}(5=)$) bei sehr vielen bzw. sogar allen Algen anzutreffen sind. Für eine Betrachtung unter taxonomischen Gesichtspunkten kommen bei den von uns untersuchten Algen somit nur die wenigen restlichen hochungesättigten Fettsäuren in Frage, nämlich die $C_{16}(3=)$ -, $C_{16}(4=)$ -, $C_{22}(5=)$ - und $C_{22}(6=)$ -Fettsäuren.

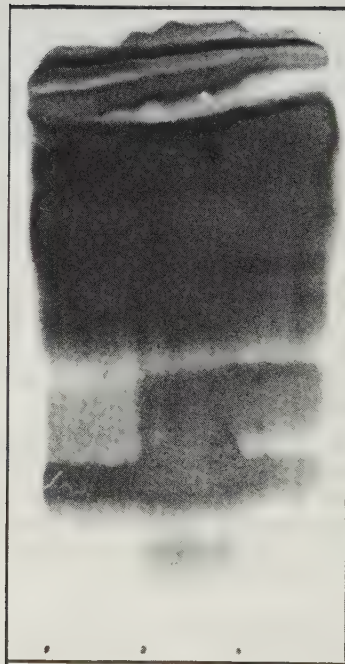
So scheint die $C_{16}(3=)$ -Fettsäure typisch für die Chlorophyta zu sein, während sich die Rhodophyta und Phaeophyta durch keine besonderen Fettsäuren charakterisieren lassen.

Wie schon erwähnt, findet sich in Übereinstimmung mit KLENK (28) bei den Ulvaceae *Ulva fasciata*, *U. lactuca* und *Enteromorpha compressa* (Klenk) die $C_{16}(4=)$ -Fettsäure. Da diese aber von KLENK (128, 129) auch in der Grünalge *Scenedesmus obliquus* (Scenedesmaceae) gefunden wurde, kann sie nicht für die Ulvaceae allein charakteristisch sein.

Wie besonders anschaulich aus Abb. 70 (Zone HT7) hervorgeht, findet sich in der zur Familie der Codiaceae gehörenden *Halimeda Tuna* (Chlorophyta) die schon erwähnte $C_{22}(6=)$ -Fettsäure. Diese Fettsäure ist hingegen nicht in den zur selben Familie gehörenden Algen *Udotea petiolata* und *Codium elongatum* enthalten (Abb. 70). Demnach kann auch dieser Fettsäure keine taxonomische Bedeutung zukommen.

Bei den beiden restlichen hochungesättigten Fettsäuren ($C_{22}(4=)$ in *Lessonia fusca* sowie $C_{22}(5=)$ in *Ulva fasciata* und *U. lactuca*) läßt sich mangels Vergleichsmaterial noch nicht endgültig entscheiden, ob sie für taxonomische Zwecke nützlich sind.

Nach unseren bisherigen Ergebnissen lassen sich somit die ungesättigten Fettsäuren nicht oder nur in Ausnahmefällen bei den Algen für eine chemotaxonomische Differenzierung verwenden. Lediglich bei einer vergleichenden Gegenüberstellung aller ungesättigten Fettsäuren lassen sich die Algengstämme voneinander abgrenzen, wie es schon auf S. 71 dargelegt wurde.



1 2 3

Abb. 70

DC der Hg-Add.

LM: IB / AS / W

(100 : 0,5 : 15,7)

1: Addukte von *Udotea petiolata*

2: Addukte von *Halimeda Tuna*

3: Addukte von *Codium elongatum*

3. Bedeutung der untersuchten Algen als eventuelle Fettquelle

Für eine eventuelle Verwendung von Algen als Fett- bzw. Fettsäure-Quelle sind 1.) die qualitative Zusammensetzung und 2.) der Gehalt an ungesättigten Fettsäuren ausschlaggebend.

Was den ersten Punkt betrifft, so besitzen die Algen vorwiegend ungesättigte Fettsäuren des Linol- und Linolensäuretyps und haben somit eine Fettsäurezusammensetzung, die der von Fischen und Säugetieren stark ähnelt. Somit würden sich die Algen auf Grund der Art ihrer ungesättigten Fettsäuren sehr gut als Fettquelle eignen.

Was den zweiten Punkt betrifft, so beträgt der Gehalt an Gesamtfettsäuren bzw. an ungesättigten Fettsäuren bei den untersuchten Rhodophyta durchschnittlich 1,2 bzw. 0,9%, bei den Phaeophyta 2,1 bzw. 1,75 % und bei den Chlorophyta 2 bzw. 1,77 % ^{x)}. Dieser Gehalt ist ohne Zweifel noch zu gering für die Verwendung der Algen als ergiebige Fettsäurequelle. Hier ist aber zu berücksichtigen, daß die untersuchten Algen unter natürlichen Bedingungen aufwuchsen, unter denen keine bevorzugte Bildung von Fetten erfolgt.

Nach den Untersuchungen von FOGG (5) kann man aber Algen unter verminderter Stickstoffzufuhr und hoher Lichtintensität zu stark vermehrter Fettbildung bringen. So gelang es Fogg, die Fettbildung bei Porphyridium (Rhodophyta) auf 5,6 - 12 % zu steigern. Ähnliches gelang bei den Chlorophyta (Chlorella, Oocystis) mit 13 - 37 %, bei den Xanthophyceae (Tribonema, Monodus) mit 8 - 34 % und bei den Diatomeae (Navicula) mit 23 - 34 %.

Nach unseren Untersuchungen kämen also vor allem die Phaeophyta und Chlorophyta wegen ihres gegenüber den Rhodophyta relativ hohen Fettsäuregehaltes für Züchtungszwecke in Frage.

x) Alle %-Zahlen beziehen sich auf das Trockengewicht der Algen und sind aus den %-Gehalten der Methylester berechnet worden. Zu dieser Berechnung wurden nur die Algen aus Neapel herangezogen, weil bei den Algen aus Chile (s. S. 27) mit einem größeren Verlust an ungesättigten Fettsäuren durch Luftoxydation zu rechnen war.

EXPERIMENTELLER TEIL

A) UNTERSUCHUNG DER UNGESÄTTIGTEN FETTSÄUREN VON SCHWEINEHIRN

1. Isolierung der Gesamtfettsäuren

50 g frisches Schweinehirn wurden in einem Multimix-Küchengerät grob zerkleinert. Dann extrahierten wir bei Zimmertemperatur und unter ständigem Schütteln viermal mit 100 ml Aceton je 15 Minuten und anschließend dreimal mit 100 ml Äther je 30 Minuten. Die vereinigten Aceton- und Äther-extrakte wurden im Vakuum vom Lösungsmittel befreit und der Rückstand nach Zusatz von 1 g Ascorbinsäure unter Stickstoff 90 Minuten mit 80 ml methanolischer n-Kalilauge verseift. Nach der Entfernung des unverseifbaren Anteils mit Petroläther säuerten wir mit Salzsäure an und isolierten die Gesamtfettsäuren mit Petroläther.

2. Dünnschichtchromatographie der ungesättigten Fettsäuren

a) Herstellung der paraffin-imprägnierten Kieselgur-Platten

Wir verwendeten Glasplatten der Dimension 12 x 20 cm. 18 g Kieselgel-G ("Merck") wurden mit 32 ml Wasser angerieben und diese Suspension mit einem Streichgerät für Dünnschichtplatten gleichmäßig in einer Schichtdicke von etwa 250 μ auf vier Platten aufgetragen. Die Platten wurden anschließend eine Stunde bei 120°C im Trockenschrank aktiviert. Die wieder abgekühlten Platten stellten wir in eine Chromatographiekammer für Dünnschichtchromatographie, in der sich eine Mischung von Petroläther und Paraffin I.R. ("Merck") (9:1) befand. Nachdem das Lösungsmittel das obere Plattenende erreicht hatte, wurden die Platten aus der Kammer genommen und eine Stunde zum vollständigen Abdunsten des Lösungsmittels an der Luft aufbewahrt.

b) Trennsystem und Laufzeit

Ameisensäure/Acetonitril (3:1), 90 ml Ameisensäure (98 - 100%, Merck) und 30 ml Acetonitril p. a. ("Merck") wurden gemischt und zum Zwecke der

Kammersättigung eine Stunde vor der ersten Chromatographie in die Kammer gegeben.

Die Laufzeit beträgt bis zu einer Höhe von 16,5 cm etwa 90 Minuten.

- c) Sichtbarmachen der chromatographierten ungesättigten Fettsäuren (s. Abb. 1)

Die Platten wurden nach der Chromatographie aus der Kammer genommen und bis zum vollständigen Abdunsten des Laufmittels unter dem Abzug aufbewahrt. Dann stellten wir sie in eine Kammer mit Osmiumtetroxid-Dampf. Nach einigen Minuten erscheinen die ungesättigten Fettsäuren als dunkle Flecken auf weißem Kieselgel-Untergrund.

3. Methylierung der Gesamt-Fettsäuren

Die Methylierung erfolgte im Wesentlichen nach der von SCHLENK und GELLERMANN (36) angegebenen Mikromethode. Zu diesem Zweck schufen wir eine einfache Apparatur, die in Abb. 71 wiedergegeben ist:

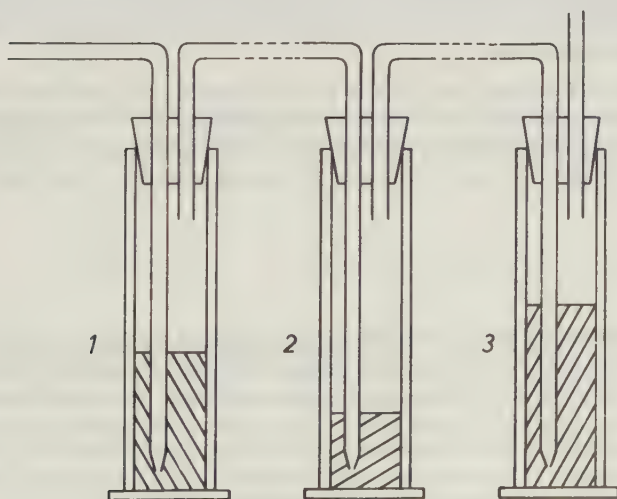


Abb. 71 : Apparatur zur Methylierung der Gesamt-Fettsäuren.

Verwendet wurden drei Glaszylinder von je 80 ml Inhalt mit je einem doppelt durchbohrten Gummistopfen. Die Zylinder waren untereinander durch Glasrohre mit einem kurzen Verbindungsstück aus PVC so verbunden, daß jeweils das unten spitz zulaufende Zuleitungsrohr bis fast auf den Grund des Zylinders reichte und das Ableitungsrohr dicht unterhalb des Gummistopfens begann. Das Zuleitungsrohr von Zylinder 1 war an eine Stickstoffbombe angeschlossen.

In den Zylinder 1 gaben wir etwa 20 ml Äther, in den Zylinder 3 die Gesamtfettsäuren, gelöst in einer Mischung von 27 ml Äther und 3 ml Methanol. Den Zylinder 2 beschickten wir mit einer Lösung von 5 g KOH (in rotulis) in 3 ml Wasser, fügten dann 5 ml Carbitol (Glykol-Monoäthyläther) hinzu und schüttelten den Zylinder etwas zur gegenseitigen Sättigung der Flüssigkeiten. Dann gaben wir eine Lösung von N-Methyl-N-nitroso-p-toluylsulfonamid (MNSA) in Äther (etwa 1,5 g MNSA auf 3 ml Äther) hinzu und verschlossen sofort alle Zylinder mit den schon vorbereiteten Gummistopfen nebst Glasrohren.

Die in den Zylinder 2 gegebene Menge MNSA berechneten wir aus der geschätzten Menge Gesamtfettsäuren. Sie lag bei unseren Versuchen zwischen 0,1 und 2 g. Für je 1 g Fettsäuren waren etwa 1,5 g MNSA erforderlich.

Die sofort einsetzende Reaktion von MNSA mit KOH unter Bildung von Diazomethan führte zum Aufschäumen der Flüssigkeit in Zylinder 2 und zu lebhaftem Überleiten von Diazomethan in Zylinder 3. Sobald sich die Reaktion nach einigen Minuten merklich verlangsamte, leiteten wir vorsichtig einen schwachen Stickstoffstrom durch Zylinder 1 und die nachfolgenden Zylinder (ca. 6 ml N₂/Minute).

Die Methylierung war nach etwa 15 Minuten beendet. Ihr Ende war dadurch zu erkennen, daß sich die Lösung der neugebildeten Fettsäuremethylester in Zylinder 3 durch überschüssiges Diazomethan gelb anfärben begann.

4. Wägung der Gesamt-Ester

Zylinder 3 wurde in ein Gefäß mit warmem Wasser gestellt und das Lösungsmittel nebst überschüssigem Diazomethan durch Aufblasen eines Stickstoffstromes auf die Flüssigkeitsoberfläche entfernt. Die Ester wurden mit etwas Petroläther quantitativ in ein tariertes Zentrifugenglas überführt, das Lösungsmittel im Stickstoffstrom (s.o.) entfernt und die Ester bis zur Gewichtskonstanz in einem vorher mit Stickstoff gefüllten Exsikkator im Vakuum über Paraffinspänen und Phosphorpentoxid getrocknet.

5. Abtrennung der gesättigten Ester

Die gewogenen Gesamttester wurden mit etwa 20 ml Aceton versetzt, über Nacht bei -25°C aufbewahrt und dann die ausgefallenen gesättigten Ester in einer Tiefkühlzentrifuge bei -25°C abzentrifugiert. Die quantitative Entfernung der gesättigten Ester war bei unserem Verfahren nicht notwendig (s.S. 83).

6. Gewichtsbestimmung der gesättigten und der ungesättigten Ester

Der Anteil an ungesättigten Estern wurde nicht direkt durch Wägung bestimmt, da diese in reinem Zustand und in konzentrierter Lösung zu oxydationsempfindlich sind.

Wir bestimmten daher das Gewicht der ungesättigten Ester indirekt aus der Gewichts Differenz zwischen Gesamttestern und gesättigten Estern. Deshalb wurde die überstehende Lösung der ungesättigten Ester sofort nach dem Zentrifugieren mit noch etwas Aceton versetzt und unter Stickstoff bei etwa 0° aufbewahrt. Die abzentrifugierten gesättigten Ester trockneten wir im Vakuum über Paraffinspänen und Phosphorpentoxid bis zur Gewichtskonstanz.

7. Dünnschichtchromatographie der ungesättigten Ester und der regenerierten Einzel-Ester (s.Abb. 2)

a) Dünnschichtplatten

Verwendet wurden wieder paraffin-imprägnierte Kieselgur-Platten, deren Herstellung bereits unter 2a) beschrieben wurde.

b) Trennsystem und Laufzeit

Ameisensäure/Acetonitril/Aceton (2:2:1), 50 ml Ameisensäure (98-100%, Merck), 50 ml Acetonitril p.a. und 25 ml Aceton wurden gemischt und zum Zwecke der Kammersättigung 1-2 Stunden vor der ersten Chromatographie in die Kammer gegeben.

c) Sichtbarmachen der ungesättigten Ester

Sie erfolgte wie unter 2c) bereits beschrieben mit Osmiumtetroxid-Dampf.

8. Bildung der Quecksilber-II-azetat-Addukte^{x)}

Die Bildung der Addukte erfolgte nach der von JANTZEN und ANDREAS (114) angegebenen Methode.

Etwa 250 mg ungesättigte Ester wurden in einer Mischung von 7 g Quecksilber-II-Azetat, 125 ml Methanol, 1,25 ml Wasser und 0,5 ml Eisessig gelöst und 48 Stunden im Dunkeln stehengelassen. Dann zogen wir das Lösungsmittel bei 25° C im Vakuum ab, suspendierten den Trockenrückstand in 30 ml Chloroform, wuschen die Mischung zur Entfernung des überschüssigen Quecksilber-Azetats fünfmal mit je 20 ml Wasser und trockneten die Chloroformlösung über Na₂SO₄ sicc.

Ausbeute: Ca. 1 g Addukte

Die Chloroformlösung der Addukte wurde im Stickstoffstrom bei 25° auf ca. 4 ml eingengt.

9. Dünnschichtchromatographie der Quecksilber-II-azetat-Addukte

a) Dünnschichtplatten

3 g Kieselgel-G ("Merck") und 7 g Kieselgur-G ("Merck") wurden gemischt, in 18 ml Wasser suspendiert und die Suspension in einer Schichtdicke von 250 μ auf zwei Platten der Dimension 12 x 20 cm aufgetragen. Wir trockneten die Platten anschließend 90 Minuten bei 55°C und bewahrten sie bis zum Gebrauch im Exsikkator unter leichtem Vakuum auf.

x) Die wichtigsten Punkte der Quecksilber-Addukt-Trennung wurden bereits mitgeteilt (132).

b) Trennsystem und Laufzeit

Isobutanol/Ameisensäure/Wasser (100 : 0,5 : 15,7)

100 ml Isobutanol p. a. ("Merck"), 0,5 ml Ameisensäure (98-100%, Merck) und 15,7 ml Wasser wurden bis zur vollständigen Mischung in einem Schütteltrichter geschüttelt und zum Zwecke der Kammer sättigung 5 Stunden vor der ersten Chromatographie in die Kammer gegeben.

Es erwies sich als vorteilhaft, die Dünnschichtchromatographie der Quecksilber-Addukte bei einer Temperatur von etwa 18 - 22° C durchzuführen.

Die Laufzeit beträgt bis zu einer Laufhöhe von 16,5 cm etwa 5 Stunden.

c) Auftragen der Addukte auf die Platte

Die in Chloroform gelösten Addukte (etwa 1 g Addukte in 4 ml Chloroform) wurden, um jede Beschädigung der Dünnschicht nach Möglichkeit zu vermeiden, mit einem weichen Pinsel strichförmig auf die gesamte Startlinie der Dünnschichtplatten aufgetragen.

d) Auftragsmenge

Pro Platte können maximal 25-30 mg Addukte entsprechend 6-8 mg ungesättigte Ester aufgetragen werden. Es ist aber ratsam, nur mit einer Menge von etwa 15 mg zu arbeiten, um jede Überladung der Platten zu vermeiden und eine optimale Trennung zu erreichen. Bei einer Konzentration von etwa 1 g Addukten in 4 ml Chloroform lassen sich etwa 10-20 mg Addukte entsprechend 2-5 mg ungesättigte Ester mit einem einzigen Pinselstrich auftragen.

Um alle vorhandenen ungesättigten Ester nachweisen zu können, benötigt man pro Platte etwa 9-12 mg Addukte entsprechend etwa 2-3 mg ungesättigte Ester. Die aufzutragende Adduktmenge richtet sich im übrigen nach Art und Zahl der vorhandenen ungesättigten Fettsäuren.

e) Sichtbarmachen der chromatographierten Addukte

Die Platten wurden sofort nach der Chromatographie im kalten Luftstrom etwa eine Minute vorgetrocknet und die noch feuchten Platten mit einer 0,1%-igen isobutanolischen Diphenylcarbazonlösung besprüht. Die einzelnen Addukte treten als blaviolett gefärbte Zonen auf schwach rosa gefärbtem Untergrund hervor ^{x)}.

10. Identifizierung der aufgetrennten Einzeladdukte

a) Vergleich mit Testsubstanzen

Die erste Charakterisierung der Adduktzonen erfolgte durch RF-Vergleich mit rein dargestellten Polyenester-Addukten, die gleichzeitig mit den zu untersuchenden Addukten chromatographiert wurden. Wir verwendeten als Testsubstanzen die Addukte der Methylester von Öl-, Linil-, Linolen- und Arachidon-Säure. Die Herstellung dieser Test-Addukte erfolgte aus den auf S. 11 aufgeführten und im Handel käuflichen ungesättigten Fettsäuren in der auf S. 81 angegebenen Weise.

b) Regenerierung der ungesättigten Einzel-Ester aus den aufgetrennten Addukten

Die genaue Bestimmung der aufgetrennten Einzeladdukte erfolgte durch Wiedergewinnung ("Regenerieren") der ungesättigten Ester aus den Addukten und die nachfolgende Identifizierung dieser Einzel-Ester.

x) Zum Nachweis eventuell vorhandener gesättigter Ester, die nicht mit Aceton ausgefällt waren, werden die Platten nach der Chromatographie vollständig im kalten Luftstrom getrocknet und mit einer 0,2%-igen wäßrigen Dichlorofluorescein-Lösung besprüht und unter dem UV-Licht betrachtet. Es zeigt sich, daß die von den gesättigten Estern herrührenden fluoreszierenden Zonen deutlich abgesetzt über allen Adduktzonen liegen. Aus diesem Grunde ist die völlige Entfernung der gesättigten Ester (s. S. 80) nicht erforderlich.

Dazu wurden die mit Diphenylcarbazon sichtbar gemachten Adduktzonen sofort nach dem Besprühen mit einer dünnen Nadel umrandet, da die Farbe nach einiger Zeit verblaßt. Dann trockneten wir die Platten im kalten Luftstrom völlig, lösten die umrandeten Zonen mit einem Spatel ab und überführten sie in Reagenzgläser.

Wir gaben in jedes Reagenzglas (die angegebenen Zahlen beziehen sich auf die Spaltung der Einzel-Addukte aus 1-2 Platten) 3 ml Methanol und 0,4 ml HCl 37% und ließen diese Mischung unter mehrmaligem Schütteln eine Stunde im Dunkeln stehen. Anschließend gossen wir die Suspension in einen 100ml-Schütteltrichter, spülten das Reagenzglas zweimal mit je 10 ml Wasser und zweimal mit je 10 ml Petroläther nach und schüttelten das Ganze kräftig durch. Nach vollständiger Trennung der Phasen wurde die wäßrige Unterphase verworfen, die Oberphase dreimal mit je 20 ml Wasser gewaschen und über Na_2SO_4 sicc. getrocknet. Dann filtrierten wir in ein Reagenzglas, wuschen das Trocknungsmittel zweimal mit je 5 ml Petroläther nach und filtrierten es ebenfalls. Danach stellten wir das Reagenzglas in ein Becherglas mit Wasser (45°) und entfernten das Lösungsmittel im Stickstoffstrom. Der Rückstand wurde mit 1,5 ml Aceton aufgenommen und in ein kleines Reagenzglas (3 ml) überführt.

c) Alkali-Isomerisation

Etwa 2/3 der nach obiger Methode erhaltenen ungesättigten Einzelester wurden der Alkaliisomerisation nach HOLMAN und HAYES (130) unterworfen (s.S. 16).

Die in Aceton gelösten Ester wurden in Isomerisationsröhrchen überführt, das Lösungsmittel im Stickstoffstrom entfernt, der Rückstand in 0,8 ml einer Mischung aus 0,85 ml Glykol-Kalilauge ($21\% \pm 0,1\%$) und 1 ml Äthanol gelöst und bei $180^\circ \pm 0,5^\circ\text{C}$ unter Stickstoff isomerisiert. Für die gleichzeitige Isomerisation mehrerer Proben stellten wir uns einen durch ein Ölbad geheizten Thermostat-Metallblock ($12 \times 12 \times 12 \text{ cm}^3$) mit 6 ölgefüllten Bohrungen ($\varnothing = 18 \text{ mm}$) her, in denen 5 Proben gleichzeitig isomerisiert werden konnten. Die 6. Bohrung diente zur Aufnahme des Thermometers.

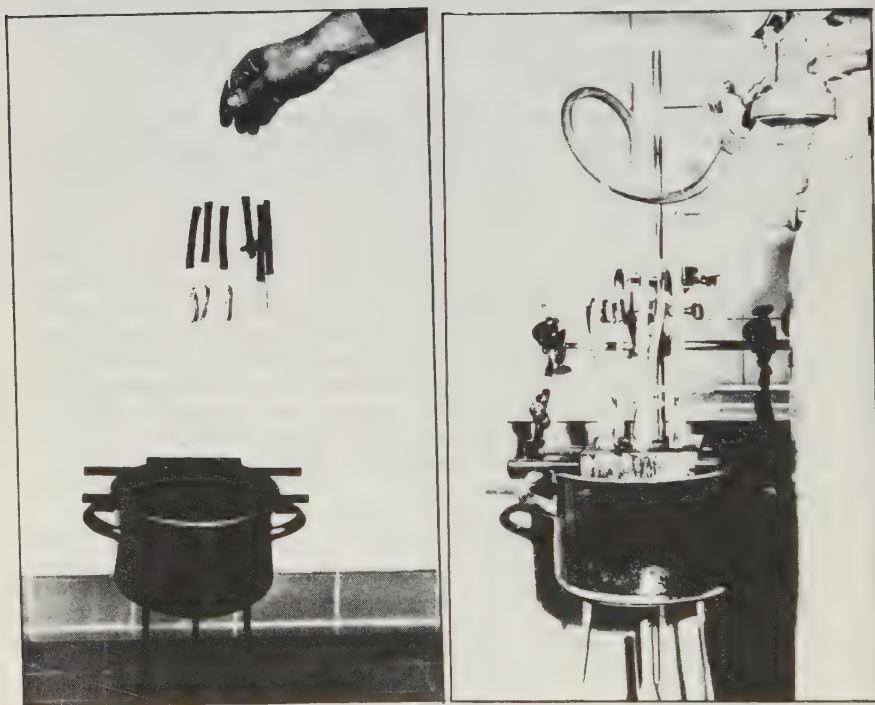


Abb. 72 und 73

Alkaliisomerisations-Anlage für die gleichzeitige Isomerisation von 5 Fett-säure- bzw. Esterproben unter Stickstoff-Atmosphäre

Die zu der Isomerisation verwendete Glykol-Kalilauge stellten wir auf folgende Weise her:

Wir erhitzen 112,9 g Glykol und 37,1 g KOH (in rotulis, 85,0%) in einem tarierten 200ml-Erlenmeyerkolben 10 Minuten unter Stickstoff auf 190°C . Gleichzeitig erhitzen wir in einem anderen Kolben etwa 50 ml Glykol 5 Minuten bis zum Sieden. Die Glykol-Kalilauge wurde nach dem Erhitzen auf 120°C abgekühlt (stets unter N_2) und mit dem anderen erhitzten Glykol auf genau das ursprüngliche Gewicht aufgefüllt, gemischt und nach vollständigem Abkühlen bei 0° unter N_2 im Dunkeln aufbewahrt. Die Lösung hielt sich unter diesen Bedingungen mehrere Monate lang ohne Dunkelfärbung.

Zur Gehaltsbestimmung wurden ca. 200 mg der Glykol-Kalilauge genau gewogen und mit $n/10$ -HCl gegen Phenolphthalein als Indikator titriert. Gehalt: $21\% \pm 0,1\%$.

Die Isomerisation führten wir bei den Proben, die Monoen-, Dien-, Trien- und Tetraen-Ester enthielten, 20 Minuten, bei den höherungesättigten Estern 11 Minuten durch. Diese unterschiedliche Behandlung ist notwendig, da nach MONTAG (133) (s. Abb. 74) die isomerisierten Diene, Triene und Tetraene nach etwa 10 bis 25 Minuten ihre maximale Konjugation erreichen, wobei der günstigste Zwischenwert bei etwa 20 Minuten liegt. Die Pentaene und Hexaene hingegen erreichen ihre maximale Konjugation bereits nach 12 bzw. 9 Minuten und werden danach vermutlich relativ rasch chemisch verändert.

Nach der Isomerisation wurden die Proben mit Methanol auf 10 oder 15 ml verdünnt und auf die übliche Weise spektralphotometrisch gegen eine unter gleichen Bedingungen isomerisierte Blindprobe gemessen. (Zeiss Spektral-Photometer P Q II)

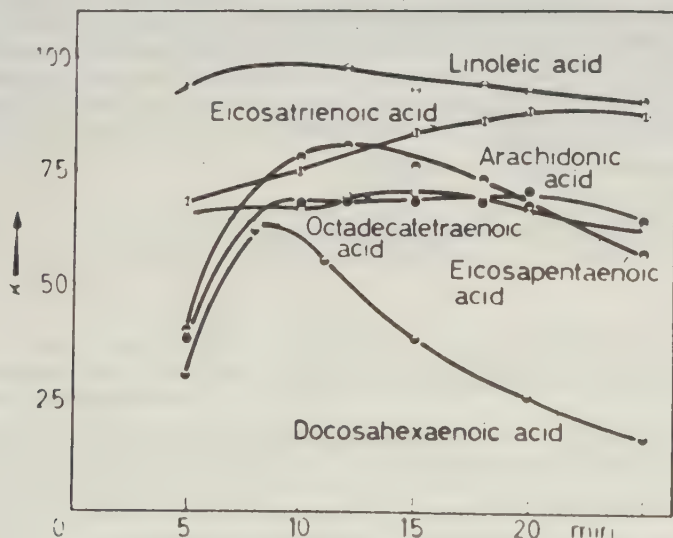


Abb. 74 : MONTAG (132)

Isomerisationskurven von ungesättigten Fettsäuren ($C_{18}(2=)$, $C_{20}(3=)$, $C_{18}(4=)$, $C_{20}(4=)$, $C_{20}(5=)$ und $C_{22}(6=)$), die mit 21%-iger Glykol-Kalilauge verschieden lang isomerisiert wurden.

d) Erneute Dünnschichtchromatographie der regenerierten Einzel-Ester

Das letzte Drittel der nach 10b) erhaltenen ungesättigten Einzelester wurde im Stickstoffstrom auf ca. 0,1 ml eingengt und gleichzeitig mit Test-Fettsäuremethylestern und einer Probe der ungesättigten Gesamtester im Laufmittel Ameisensäure/Acetonitril/Aceton (2:2:1) wie unter 7.) beschrieben erneut chromatographiert.

e) Gas-Chromatographie

Wir verwendeten dazu einen Gaschromatographen Modell Packard 7010
Säule (Glas): 2 m x 4 m
Trägermaterial: EGSS (15% Äthylenglykol-Succinat-Silicon) (Applied Science Laboratories) auf Gaschrom P (100 - 200 mesh)
Säulentemperatur: 189°
Detektor-Temperatur: 215°
Einspritz-Temperatur: 280°
Auslaß-Temperatur: 240°
Strömungsgeschwindigkeit: 60 ml/Min.
Trägergas: Argon
Papiervorschub: 5 Min./inch (5 mm/Min.)
Einspritzmenge: ca. 0,1 mg Fettsäuremethylester

B) UNTERSUCHUNG DER MEERES-ALGEN

1. Sammeln und botanische Bestimmung des Untersuchungsmaterials
 - a) Algen aus Chile

Diese Algen wurden uns von der Meeresbiologischen Station Vina del Mar der Universität von Santiago de Chile in getrocknetem und unzerkleinertem Zustand übersandt. Nicht bekannt war uns die Art des Sammelns und Trocknens. Die Algen wurden nach Erhalt gemahlen und sofort extrahiert. Bei der Alge *Codium Stackhouse* konnten wir nicht die genaue Art erfahren.

b) Algen aus Neapel

Diese Algen sammelte ich aus einheitlichen, freiwachsenden und nicht gezüchteten Beständen in den Monaten März bis Juni 1964 im Golf von Neapel. Anschließend wurde jede Art nochmals in seewassergefüllten Schalen (Pflanze für Pflanze) auf ihre botanische Identität geprüft.

2. Extrakte

a) Algen aus Chile

Das Trockenmaterial wurde zweimal mit der doppelten Gewichtsmenge an Aceton je 12 Stunden unter Schütteln kalt extrahiert und dann fünfmal je 12 Stunden mit einer Mischung von Chloroform und Methanol (1:2) am Rückflußkühler extrahiert. Beide Extrakte wurden für sich bis zur Trockne eingengt und über Phosphorpentoxid und Paraffinspänen bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Bei beiden Extrakten wurde der Gehalt an Phosphor bestimmt (s.u.).

b) Algen aus Neapel

Da diese Algen sofort frisch verarbeitet wurden, ermittelten wir ihr Trockengewicht durch Trocknung einer nicht für die Untersuchung verwendeten Vergleichsprobe.

Die frischen Algen wurden durch leichtes Abpressen mit der Hand oder durch Abschütteln von dem größten Teil des Seewassers befreit und gewogen. Dann zerkleinerten wir sie unter Zusatz von Aceton in einem Multi-mix-Küchengerät oder zerschnitten sie mit einem Wiegemesser. Das zerkleinerte Algenmaterial wurde zweimal je 12 Stunden mit kaltem Aceton unter Schütteln extrahiert und dann vier- bis sechsmal je 12 Stunden mit Chloroform-Methanol (1:2) bis zur Farblosigkeit des Extraktionsmittels extrahiert.

Die beiden Extrakte wurden für sich bis zur Trockne eingengt, in Chloroform aufgenommen und filtriert. Auf diese Weise ließen sich Schleim und anorganische Salze als unlösliche Bestandteile entfernen. Die Extrakte wur-

den erneut bis zur Trockne eingeengt und über Phosphorpentoxid und Parafinspänen bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und der Phosphorgehalt bestimmt. Diese Bestimmung des Phosphorgehaltes erfolgt nach einer von LOWRY und Mitarb. (134) angegebenen und von uns modifizierten Methode:

3. Phosphor-Bestimmung

Ein genau gewogener Teil der Aceton- und Chloroform-Methanol-Extrakte (ca. 4 mg) wurde nach Zugabe von 0,5 ml Ammonmolybdat-gesättigter Perchlorsäure 4 Std. im Veraschungsblock bei 180°C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden 5 ml einer Lösung von 8 Teilen HClO_4 (3,85%), 1 Teil Ammoniummolybdatlösung (2,5%) und 1 Teil Ascorbinsäurelösung (10%) hinzugefügt und 2 Std. bei 38° aufbewahrt.

Die Farbintensität wurde gegen die einer Standardlösung mit bekanntem Phosphorgehalt im Photometer gemessen (Eppendorf Photometer, Filter Hg 772, Photozelle 90 r).

4. Verseifung und Abtrennung des unverseifbaren Anteils

Die vereinigten Aceton- und Chloroform-Methanol-Extrakte wurden mit der 20-fachen Menge methanolischer n-Kalilauge unter Zusatz von 1 g Ascorbinsäure unter Stickstoff 90 Minuten verseift. Anschließend wurde die Mischung auf Zimmertemperatur abgekühlt, mit der doppelten Menge Wasser versetzt und der unverseifbare Anteil durch zweimaliges Ausschütteln mit Petroläther entfernt. Bei den Algen aus Chile war der unverseifbare Anteil stark grün gefärbt, bei den Mittelmeer-Algen dagegen gelb-rot.

5. Isolierung der Gesamt-Fettsäuren und Abtrennung der Farbstoffe

Nach dem Ansäuern der verseiften Extrakte mit verdünnter Salzsäure (12,5%) bis etwa pH2 und Abkühlen wurden die Gesamtfettsäuren durch viermaliges Ausschütteln mit Petroläther extrahiert.

Zur Reinigung der durch gelbe, rote und grüne Farbstoffe (Karotinoide, Chlorophyll) verunreinigten Petrolätherlösung der Gesamtfettsäuren wurde die Lösung zunächst im Vakuum bis auf wenige Milliliter eingengt und anschließend sofort durch ein spezielles Quarzpulver-Kohle-Filter filtriert. Das hierzu benutzte Filter wurde folgendermaßen hergestellt:

Der in Abb. 75 gezeigte Glastrichter A (oberer Durchmesser ca. 3 cm) wurde mit einem Glaswattebausch D abgedichtet und unter ständigem Absaugen eine Suspension von Aktivkohle in Methanol aufgegossen, bis sich eine etwa 8 mm dicke gleichmäßige Kohleschicht C gebildet hatte. Anschließend wurde eine Suspension von Quarzpulver in Methanol zugegossen, bis sich eine etwa 15 mm dicke gleichmäßige Schicht B gebildet hatte. Dann wur-

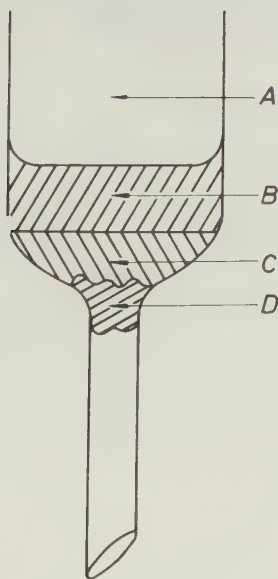


Abb. 75 : Quarzpulver-Kohle-Filter zur Abtrennung der Farbstoffe

den nacheinander je 20 ml Aceton, Chloroform und Petroläther durchgesaugt und das Absaugen solange fortgesetzt, bis kein Petroläthergeruch mehr wahrnehmbar war. Das Filter wurde 12 Stunden auf 160°C erhitzt und nach dem Abkühlen unter erneutem Absaugen die zusammengebackene und von Rissen durchzogene Quarzpulverschicht vorsichtig ohne Beschädigung der Kohleschicht mit einer Nadel aufgelockert und wieder grob pulverisiert. Unter ständigem weiteren Absaugen wurde dann die Quarzpulverschicht mit einem geeigneten abgerundeten Gegenstand (am besten verwendet man dazu ein kleines Zentrifugenglas mit einem Durchmesser von etwa 12 mm) festgepreßt, sodaß die Quarzschicht an der Innenseite des Glastrichters etwas emporgedrückt wurde.

Die stark eingeengte Petrolätherlösung der Gesamtfettsäuren wurde unter Absaugen durch das Filter filtriert und mit ca. 500-750 ml Petroläther nachgewaschen. Die nunmehr völlig farblose Petrolätherlösung wurde am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit, die erhaltenen freien Gesamtfettsäuren mit einer Mischung von 27 ml Äther und 3 ml Methanol aufgenommen und anschließend sofort methyliert.

ANHANG

DIE ENTWICKLUNG DER FETTSÄUREBILDUNG IM VERLAUF DER EVOLUTION DER LEBEWESSEN

Bei der Betrachtung des Fettsäuregehaltes der Meeres-Algen drängt sich die Frage auf, welche Stellung die Algen auf Grund der Zusammensetzung ihrer Fettsäuren im Pflanzenreich einnehmen und ob sich zu den Landpflanzen, die sich höchstwahrscheinlich aus den Chlorophyta entwickelt haben, Beziehungen aufzeigen lassen, ja ob sich überhaupt im Reich der Lebewesen hinsichtlich der Fettsäurebildung eine Entwicklungslinie verfolgen läßt.

In den letzten Jahren ist eine Reihe von analytischen und biochemischen Arbeiten erschienen, die sich vor allem mit dem Vorkommen von ungesättigten Fettsäuren in Pflanzen und Tieren, mit der Ermittlung ihrer chemischen Konstitution und mit ihrer Biosynthese bzw. Herkunft beschäftigten. Da die meisten dieser Arbeiten im wesentlichen unter chemischen oder biochemischen und nur selten unter systematischen Gesichtspunkten durchgeführt wurden, ergaben sich zahlreiche Einzelbefunde, die nur in einigen Fällen in einen Zusammenhang miteinander gebracht werden konnten.

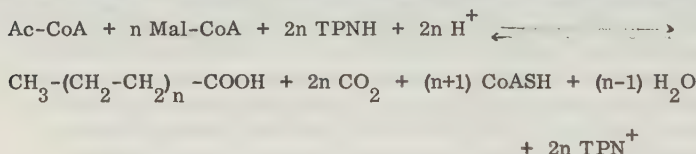
So faßte HILDITCH (135) 1956 die Kenntnisse über die Fettsäuren in der Meeres-Flora dahingehend zusammen, daß in den Grünalgen vor allem die C₁₆- und C₁₈-Fettsäuren, weniger die C₂₀- und C₂₂-Fettsäuren anzutreffen sind, während bei den Braun- und Rot-Algen die C₂₀-Fettsäuren überwiegen. Eingehende Vergleiche innerhalb der Algen und vor allem mit den angrenzenden Organismengruppen wurden bisher nicht gemacht.

Im folgenden wird deshalb der Versuch gemacht, unter Verwertung auch der von uns erbrachten Resultate die analytischen und biochemischen Forschungsergebnisse auf dem Gebiet der Fettsäuren, soweit dies nach dem heutigen Stand der Kenntnisse möglich ist, unter dem Gesichtspunkt der Entwicklung der Fettsäure-Bildung im Verlauf der Evolution der Lebewesen zusammenzufassen.

A) VORKOMMEN UND BIOSYNTHESE DER GESÄTTIGTEN FETTSÄUREN

Die enzymatischen Vorgänge bei der Biosynthese der gesättigten Fettsäuren sind im wesentlichen durch die Arbeiten von LYNEN (136-144), WAKIL (145-151), VAGELOS (152, 156), 157, 158), BRADY (221) u. a. aufgeklärt worden.

Im Prinzip beginnt diese Biosynthese beim Acetyl-Coenzym A, aus dem unter Mitwirkung von enzymproteingebundenem Biotin durch Anlagerung von CO₂ Malonyl-Coenzym A gebildet wird. Durch Verknüpfung von mehreren Malonylresten unter Abspaltung von CO₂ geht dann eine Kettenverlängerung um jeweils zwei C-Atome vor sich. Diese mehrmaligen Verlängerungsschritte werden von dem von LYNEN (141) beschriebenen Multienzymkomplex in einem Gang durchgeführt, wobei als Endprodukte die Palmitin- bzw. die Stearinsäure entstehen. Die Gesamtgleichung für diese Synthese lautet:



Für die Bildung der Palmitinsäure ist n=7, für die der Stearinsäure ist n=8.

Diese Biosynthese verläuft anaerob, zur Kettenverlängerung ist also kein Sauerstoff erforderlich.

Die gesättigten Fettsäuren finden sich bereits bei den Bacteriophyta und von da an in allen lebenden Organismen. Eine Variante der normalen geradkettigen Fettsäuren stellen die verzweigt-kettigen Fettsäuren dar, die jedoch relativ selten auftreten. Unter ihnen ist die Methylstearinsäure (Tuberculo-Stearinsäure) von Mycobacterium tuberculosis (153, 154) ein bekanntes Beispiel. Wie BLOCH (82) sowie JAUREGUIBERRY (155) zeigen konnten, entsteht diese Fettsäure durch Transmethylierung von Ölsäure mit Methionin. Eine weitere Abweichung von den Normtypen stellen die Cyclopropan- und die Hydroxy-Fettsäuren dar. Ihr Vorkommen ist noch wenig systematisch untersucht, scheint aber mehr sporadisch zu sein. Weiterhin können neben den geradkettigen Fettsäuren in geringer Menge noch solche mit ungerader Kohlenstoffzahl (C₁₇, C₁₉ u. a.) auftreten.

Abgesehen von den obigen Ausnahmen herrscht im Reich der Lebewesen hinsichtlich der gesättigten Fettsäuren weitgehende Uniformität. Beginnend mit den Bacteriophyta kehren in allen Pflanzen und Tieren die gleichen gesättigten Fettsäuren von C₂ bis C₁₈ wieder. Längerkettige Fettsäuren wie

die C₂₀-, C₂₂- und C₂₄-Fettsäuren finden sich selten und dann nur in kleinen Mengen. Somit kann man bei der Betrachtung der gesättigten Fettsäuren keine wesentliche Weiterentwicklung über die Bacteriophyta hinaus feststellen. Die Zahl dieser Fettsäuren ist außerdem relativ gering, da zwischen C₂ und C₂₀ nur 10 geradkettige gesättigte Fettsäuren auftreten.

B) VORKOMMEN UND BILDUNG DER UNGESÄTTIGTEN FETTSÄUREN

Günstiger liegen die Verhältnisse bei den ungesättigten Fettsäuren. Zunächst eignen sich diese allein auf Grund ihrer größeren Zahl besser zu solchen Untersuchungen als die gesättigten Fettsäuren. So existieren etwa 35 - 40 verschiedene Fettsäuren, die den C₁₆- bis C₂₂-Reihen angehören und sich nach Kettenlänge sowie Zahl und Lage der Doppelbindungen voneinander unterscheiden. Durch das Auftreten von Stereoisomeren wird diese Zahl noch weiter vermehrt.

Weiterhin ergeben sich im Gegensatz zu den gesättigten Fettsäuren bei den ungesättigten Fettsäuren charakteristische Unterschiede zwischen den Gruppen des Pflanzenreiches (Bacteriophyta, Flagellatae, Algen und Landpflanzen).

Es erscheint daher sinnvoller, von nun an die Bildung der ungesättigten Fettsäuren im Verlauf der Evolution der Lebewesen zu verfolgen.

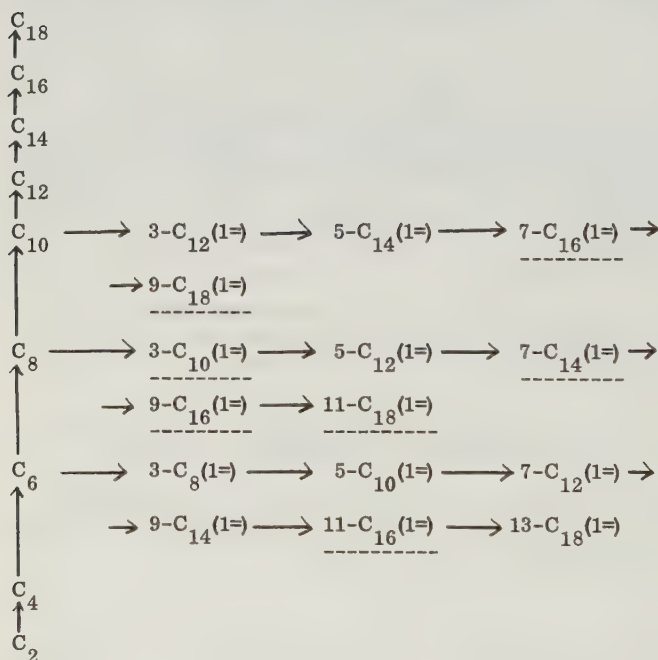
Der besseren Übersicht wegen wird hier diese Entwicklung zunächst im Verlauf der Evolution der Pflanzen betrachtet, und dann die Fettsäurebildung bei den Tieren besprochen.

1. Biosynthese der ungesättigten Fettsäuren bis zu den Bacteriophyta

Über die biochemischen Vorgänge bei der Bildung der ungesättigten Fettsäuren - z. Z. Gegenstand von Untersuchungen durch BLOCH (121, 159-163, 167, 169, 178-180), JAMES (79, 164), STUMPF (75, 164-166) u. a. - sind wir bis heute noch relativ unvollkommen unterrichtet. Dagegen liegen zahlreiche Arbeiten über das Vorkommen von ungesättigten Fettsäuren vor.

a) Anaerober Synthese-Weg

1961 untersuchte BLOCH (121, 167) *Clostridium butyricum*, einen anaeroben Bacteriophyt, der ungesättigte Fettsäuren enthält. Bloch stellte fest, daß dieser Organismus die ungesättigten Fettsäuren auf einem anaeroben Synthese-Weg bildet, für den er später (168) das folgende Schema vorschlug:



Anaerobe Bildung der ungesättigten Fettsäuren in Mikroorganismen (nach BLOCH (168)) (Die unterstrichenen Fettsäuren wurden bisher gefunden)

Charakteristisch sind die zunächst postulierten intermediären Fettsäuren $3-C_8(1=)$, $3-C_{10}(1=)$ und $3-C_{12}(1=)$, deren Auftreten später durch BLOCH (162) z. T. bestätigt wurde.

Ein ähnlicher Biosyntheseweg ist auch bei *Agrobacterium tumefaciens* (170), *Escherichia Coli* (171, 162, 178), *Lactobacillus arabinosus* (172, 173), *Rhodopseudomonas* sp. und *Rhodospirillum rubrum* (174) und *Streptococ-*

cus sp. (175) zu vermuten, weil auch bei diesen die für den anaeroben Synthese-Weg anscheinend charakteristische 11-C₁₈(1=)-Fettsäure (cis-Vaccen-Säure) gefunden wurde.

Dieser anaerobe Weg zu den ungesättigten Fettsäuren findet sich anscheinend nur in den Bacteriophyta. Er führt nur bis zu den mono-ungesättigten Fettsäuren.

b) Aerober Synthese-Weg

Anders als bei den oben aufgeführten Organismen, die sämtlich den Eubacteriales angehören, stellte BLOCH (163, 82) bei dem zu den Actinomycetales gehörenden Mycobacterium phlei fest, daß dieser Bacteriophyt seine ungesättigten Fettsäuren auf aerobem Weg synthetisiert, weil bei diesem Organismus zur Bildung der Ölsäure aus Stearinsäure molekularer Sauerstoff notwendig ist. Bei dem ebenfalls zu den Actinomycetales gehörenden Streptomyces erythreus bilden sich nach den Untersuchungen von HOFHEINZ (176) sogar Linolsäure und in geringen Mengen Linolensäure.

Auf Grund seiner Beobachtungen äußerte Bloch zunächst die Vermutung, daß die Eubacteriales den anaeroben und die Actinomycetales den aeroben Weg besitzen und daß die Verteilung dieser beiden verschiedenen Synthesewege den evolutionären Linien folge.

BLOCH (177) fand jedoch 1964, daß bei den zu den Eubacteriales gehörenden Corynebacterium diphtheriae und Micrococcus lysodeikticus die Palmitolein- (9-C₁₆(1=)) und die Ölsäure auf dem aeroben Weg aus den entsprechenden gesättigten Fettsäuren gebildet werden. Außerdem gibt es noch weitere Hinweise dafür, daß bei den Bacteriophyta der Übergang von der "primitiveren" anaeroben Synthese der ungesättigten Fettsäuren zu der aeroben offenbar nicht sprunghaft, sondern nach und nach vollzogen wurde. So findet sich z.B. in Escherichia Coli und Pseudomonas fluorescens (161) trotz Anpassung an die aerobe Lebensweise der anaerobe Syntheseweg. Weiterhin werden die bei Streptomyces erythreus gefundenen Linol- und Linolensäure unter anaeroben Bedingungen nicht gebildet. Beide Fettsäuren fehlen bei Streptomyces halstedii (176).

Bei den Bacteriophyta besteht somit neben der üblichen anaeroben Bildung der gesättigten Fettsäuren auch ein anaerober Syntheseweg zu den ungesättigten Fettsäuren, der aber hauptsächlich nur zu den Monoenfettsäuren (Palmitolein- und Ölsäure) führt. Im Laufe der Evolution muß dann durch

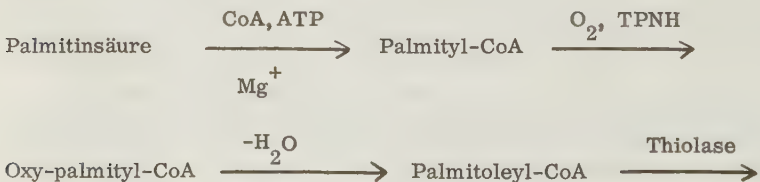
Einbeziehung des Luftsauerstoffs die aerobe Synthese hinzugekommen sein. Es ist anzunehmen, daß durch die Verwendung des Sauerstoffs die Dehydrierung der gesättigten Fettsäuren zu den ungesättigten leichter von staten ging als auf anaerobem Wege.

Beide Wege zu den genannten Fettsäuren sind nicht scharf getrennt, sondern existieren z. T. nebeneinander, weil der Übergang offenbar nicht sprunghaft erfolgte.

Bei allen im System folgenden höheren Organismen findet sich von nun an der aerobe Weg. Dabei ist bis heute noch nicht geklärt, ob der anaerobe Weg zur Palmitolein- und Ölsäure neben dem aeroben noch teilweise oder ganz weiterbesteht oder vollständig aufgegeben wurde.

2. Entwicklung der Fettsäure-Synthese von den Bacteriophyta bis zu den Phytoflagellatae

Die oben geschilderten Untersuchungen über die Bildung der ungesättigten Fettsäuren in anaeroben Bacteriophyta waren z. T. durch Beobachtungen angeregt worden, die ANDREASSEN und STIER (181) bereits 1954 gemacht hatten. Sie hatten festgestellt, daß anaerob gezüchtete Hefe u. a. eine ungesättigte Fettsäure als Wachstumsfaktor benötigt. Man schloß daraus, daß Hefe eventuell die ungesättigten Fettsäuren nur bei Gegenwart von Sauerstoff bilden könne. Dadurch angeregt, stellte BLOCH (160, 180, 182) neben seinen Untersuchungen an *Clostridium but.* (s. o.) 1960 fest, daß Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) zur Bildung der in 9-Stellung ungesättigten Fettsäuren tatsächlich molekularen Sauerstoff benötigt. Die ungesättigten Fettsäuren werden direkt aus den entsprechenden gesättigten Fettsäuren nach dem folgenden Schema gebildet:



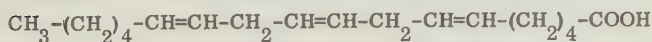
Palmitoleinsäure + CoA

In weiteren Experimenten stellte BLOCH (169) bei der Untersuchung der lipoidreichen Hefe *Torulopsis utilis* einen hohen Gehalt an Linolsäure (9,12-C₁₈(2=)) sowie an δ -Linolensäure (6,9,12-C₁₈(3=)) fest. Die Bildung der Linolsäure erfolgt rasch aus der Ölsäure und erforderte Sauerstoff, ebenso die Bildung der δ -Linolensäure. Im Gegensatz zur Linolsäure wurde aber die δ -Linolensäure nur sehr langsam und in kleinen Mengen gebildet.

1963 untersuchte BLOCH (183) die zu den Phytoflagellaten gehörenden Euglenophyten *Euglena gracilis* und *Astasia longa* sowie die zu der flagellaten Organisationsstufe der Chlorophyta gehörenden *Polytoma uvella* und *Chlamydomonas reinhardtii*. *Euglena gr.* und *Chlamydomonas r.* besitzen Assimilationspigmente, *Astasia l.* und *Polytoma u.* hingegen nicht. Bloch wies nach, daß *Euglena* und *Chlamydomonas* im Licht große Mengen von α -Linolensäure (9,12,15-C₁₈(3=)) bilden. Im Dunkeln wurde diese Fettsäure nur in geringen Mengen produziert, dafür stieg der Anteil der δ -Linolensäure (6,9,12-C₁₈(3=)) beträchtlich an (*Chlamydomonas*). Diese Fettsäure fand sich auch in größeren Mengen in den farblosen Flagellaten *Polytoma* und *Astasia*, während diese die α -Linolensäure nur in geringen Mengen bzw. garnicht enthielten. In den farblosen und in allen im Dunkeln gezüchteten Flagellaten war außerdem der Anteil der ungesättigten C₂₀-Fettsäuren erhöht. Bei *Euglena* wurden im Dunkeln außer diesen auch höherungesättigte C₂₂- und C₂₄-Fettsäuren festgestellt, die sich sowohl von der α - als auch von der δ -Linolensäure ableiten.

Bemerkenswert ist hier das erstmalige Auftreten der α -Linolensäure. Diese Fettsäure tritt offenbar nur im Licht auf und scheint nach den Untersuchungen von Bloch an das Vorhandensein von Chlorophyll gebunden zu sein. Da die Bildung dieser Säure durch Hill-Reaktions-Inhibitoren stark gehemmt wird, scheint α -Linolensäure in engem Zusammenhang mit der Lichtreaktion der Photosynthese zu stehen, und zwar scheint sie speziell eine Rolle bei der Bildung des dabei entstehenden Sauerstoffs zu spielen.

An dieser Stelle muß darauf hingewiesen werden, daß anscheinend bereits von Anfang an die Anlage neuer Doppelbindungen im "Divinylmethan-Rhythmus" (nach Klenk) vor sich ging, d. h. daß die Doppelbindungen stets durch zwei einfache Bindungen getrennt sind, wie es am Beispiel der δ -Linolensäure (6,9,12-C₁₈(3=)) gezeigt werden soll:



Die Bildung der Linolsäure aus der Ölsäure durch Einführung einer zweiten Doppelbindung in 12-Stellung ist dadurch charakterisiert, daß die Anlage der neuen Doppelbindung in Richtung auf das Methyl-Ende der Fettsäure-Kette erfolgt. Anscheinend erfordert die Anlage einer neuen Doppelbindung in die-

ser Richtung einen erheblich größeren Energie-Aufwand als in Richtung auf das Carboxyl-Ende. Die Anlage neuer Doppelbindungen in Richtung auf das Carboxyl-Ende erfolgt nämlich überall im Reiche der Lebewesen relativ leicht, nicht hingegen in Richtung auf das Methyl-Ende, sofern diese überhaupt erfolgt.

Beispielsweise wird aus der Ölsäure relativ leicht die typengleiche 6,9-C₁₈(2=)-Fettsäure (Ölsäure-Typ) und aus der Linolsäure die typengleiche 6,9,12-C₁₈(3=)-Fettsäure (γ -Linolensäure, Linolsäure-Typ) gebildet.

Erst in Verbindung mit der Fähigkeit zur Photosynthese scheinen die Pflanzen zum zweiten Male eine weitere Doppelbindung in Richtung auf das Methyl-Ende bilden zu können. Dieser Schritt führt zur Bildung der α -Linolensäure (9,12,15-C₁₈(3=)), die in Euglena und Chlamydomonas gefunden wurde und für alle nachfolgenden höheren Pflanzen charakteristisch ist.

Die Untersuchungen über ungesättigte Fettsäuren in Flagellaten wurden durch KORN (184) fortgesetzt, der ebenfalls Euglena gracilis untersuchte. Korn stellte 51 ungesättigte Fettsäuren fest und klärte sie strukturell auf. Neben den schon bekannten Fettsäuren fand er in geringeren Mengen zahlreiche ungesättigte Fettsäuren der C₁₅-, C₁₇-C₁₉- und C₂₁-Reihen sowie folgende Sequenz von C₁₆-Fettsäuren: C₁₆, 7-C₁₆(1=), 7,10-C₁₆(2=), 7,10,13-C₁₆(3=) und 4,7,10,13-C₁₆(4=). Über die Bildung und Bedeutung dieser ungeradkettigen und C₁₆-Fettsäuren ist bis jetzt noch relativ wenig bekannt.

Eine interessante Erweiterung der Korn'schen Studien stellen die Untersuchungen von SCHLENK (185) dar, der bei der Phytoflagellate Ochromonas danica folgende Fettsäurezusammensetzung ermittelte:

C ₁₄ , C ₁₆ , C ₁₈ und C ₂₀	29 %
9-C ₁₈ (1=) (Öl-S.)	8 %
9,12-C ₁₈ (2=) (Linol-S.)	16 %
6,9,12-C ₁₈ (3=) (γ -Linolen-S., Linol-Typ)	10 %
9,12,15-C ₁₈ (3=) (α -Linolen-S.)	2 %
8,11,14-C ₂₀ (3=) (Linol-Typ)	5 %
5,8,11,14-C ₂₀ (4=) (Linol-Typ)	11 %
4,7,10,13,16 - C ₂₂ (5=) (Linol-Typ)	2-4 %

Zu beachten ist hier zunächst ebenfalls das gemeinsame Auftreten von - Linolensäure und Chlorophyll. Weiter ist bemerkenswert, daß neben der in größerer Menge vorhandenen Linolensäure erstmals Polyen-Fettsäuren der C₂₀- und C₂₂-Reihen auftauchen, die, wie wir heute wissen, ebenso wie die schon bekannte γ -Linolensäure aus der Linolensäure gebildet werden und wegen ihrer strukturellen Übereinstimmung als "Linolensäure-Familie" (nach Klenk, s. S. 106) bezeichnet werden.

Aus der in relativ geringer Menge vorhandenen α -Linolensäure werden bei Ochromonas d. noch keine C₂₀- und C₂₂-Fettsäuren gebildet.

Soweit es sich bisher überblicken läßt, werden auf dem Weg von den Bac-
teriophyta zu den Phytoflagellaten 1.) aus der Ölsäure die Linolensäure durch
erstmalige Neueinführung einer Doppelbindung in Richtung auf das Methyl-
Ende gebildet, aus der sich dann durch Doppelbindungseinbau in Richtung
auf die Carboxylgruppe und Kettenverlängerung am Carboxyl-Ende weitere
höherungesättigte und längerkettige Fettsäuren vom "Linol-Typ" aufbauen.

Ein zweiter wichtiger Schritt ist die Bildung der α -Linolensäure, die aus
der Linolensäure durch eine zweite Neueinführung einer Doppelbindung in
Richtung auf das Methyl-Ende entsteht. Auch von dieser Fettsäure leiten
sich (s. Euglena gr.) höherungesättigte Fettsäuren vor allem der C₂₀-Reihe
ab.

In Schema 1 (S. 111) wird versucht, die Entwicklung der Fettsäurebildung
bis zu den Phytoflagellaten darzustellen.

3. Entwicklung der Fettsäuresynthese von den Phytoflagellaten bis zu den Algen

Bei der weiteren Betrachtung dieser Entwicklung kann man von der An-
nahme ausgehen, daß die Phytoflagellaten einen breiten Grundstock bilden,
aus dem sich u. a. die verschiedenen Algenstämme getrennt voneinander
entwickelt haben (s. Abb. 76)

Unsere Untersuchungen sowie die von KLENK (127, 128, 129) zeigen, daß
man bei den Algen im wesentlichen zunächst die gleichen ungesättigten Fett-
säuren findet, die bereits bei den Phytoflagellaten vorkommen, und daß
darüberhinaus die Bildung von höherungesättigten und längerkettigen Fett-
säuren, die sich von der Linol- und α -Linolensäure ableiten, bis zu einem
Höhepunkt weiter fortgesetzt wird.

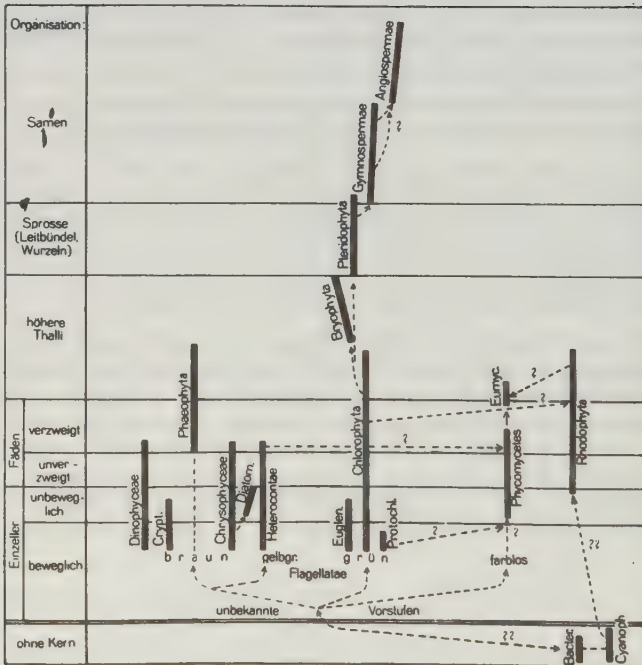


Abb. 76 : Entwurf eines Stammbaumes der Pflanzen
(nach HARDER) (212)

So findet man bei den Algen vornehmlich die der Linol- bzw. α -Linolensäure typengleichen ungesättigten Fettsäuren der C_{18} -, C_{20} - und C_{22} -Reihen mit 1 - 6 Doppelbindungen sowie die der C_{16} -Reihe, die vermutlich eine Sonderstellung einnehmen (s. Tab. 5 S. 73). Die auffallend starke Bildung der C_{20} -Fettsäuren, vor allem der $C_{20}(4=)$ -Fettsäure, bei den Rhodophyta könnte dadurch zu erklären sein, daß bei diesen im Durchschnitt am tiefsten im Meer lebenden Algen infolge des relativ geringen Chlorophyllgehaltes (186) die Bildung der ungesättigten Fettsäuren vorwiegend auf dem bei Euglena (S. 98) beschriebenen "Dunkelweg" vor sich geht, der ja vor allem zu den höherungesättigten C_{20} -Fettsäuren führt.

In Schema 2 (S. 111) ist die Entwicklung der Fettsäurebildung bis zu den Algen dargestellt.

4. Entwicklung der Fettsäuresynthese von den Algen bis zu den Landpflanzen

Beim Übergang von den Algen zu den Landpflanzen tritt eine bemerkenswerte Änderung im Sinne einer allmählichen Rückbildung ein: Die Synthese der ungesättigten C_{20} - und C_{22} - und der $C_{18}(4=)$ -Fettsäuren wird anscheinend nach und nach wieder aufgegeben.

Während nach den kürzlichen Untersuchungen von WAGNER (187) bei dem Laubmoos *Rhytidiadelphus triquetrus* noch in verhältnismäßig hoher Konzentration die $C_{20}(4=)$ - und $C_{20}(5=)$ -Fettsäuren vorkommen, findet man beim Bärlapp (*Lycopodium clavatum*) nur noch geringe Mengen dieser Fettsäuren. Die $C_{18}(4=)$ -Fettsäure fehlt bei beiden. Bei den Flechten finden sich in *Parmelia physodes* ebenfalls nur Spuren von C_{20} - und C_{22} -Fettsäuren, bei *Usnea barbata* daneben noch die $C_{18}(4=)$ und in *Cetraria islandica* nur noch die Fettsäuren der C_{18} -Reihe einschließlich der $C_{18}(4=)$ -Fettsäure.

Bei den Gymnospermen und Angiospermen sind die höherungesättigten C_{20} -Fettsäuren nicht mehr anzutreffen. Auch die $C_{18}(4=)$ -Fettsäure wird nur noch vereinzelt, und zwar - soweit bis heute bekannt - ausschließlich bei den Boraginaceae (188-190) gefunden. Vereinzelt wurden bisher noch Monoene und Diene der C_{20} -Reihe angetroffen.

In Schema 3 und 4 (S. 112) ist dargestellt, wie weit nach den heutigen Kenntnissen die Bildung der ungesättigten Fettsäuren bei den Landpflanzen geht. Ob und wie weit diese offenbar allmähliche Rückbildung der Fettsäure-Synthese mit der Änderung der ökologischen Verhältnisse beim Übergang von den Algen zu den Landpflanzen zusammenhängt, muß noch näheren Untersuchungen überlassen bleiben.

Im folgenden Schema (Abb. 77) wird versucht, die Entwicklung der Fettsäure-Synthese im Pflanzenreich graphisch darzustellen.

Entwicklung der Fettsäure-Synthese im Pflanzenreich

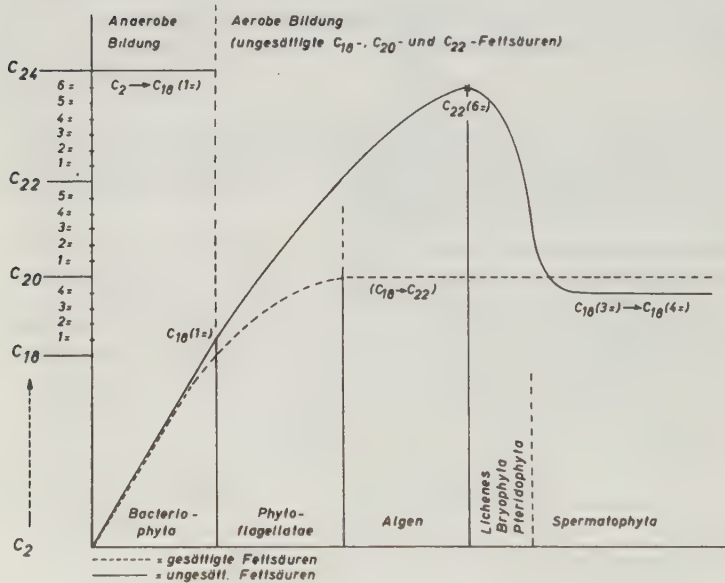


Abb. 77 : Graphische Darstellung der Entwicklung der Fettsäure-Bildung bei den Pflanzen

Beim Vergleich der Landpflanzen mit den weniger hoch entwickelten Algen und Phytoflagellaten zeigt sich also auch im Falle der ungesättigten Fettsäuren, daß der Höhepunkt der "inneren" Evolution relativ rasch erreicht wurde. Während die weniger hoch entwickelten Formen (Algen, Flagellaten) durch eine große Mannigfaltigkeit an ungesättigten Fettsäuren ausgezeichnet sind, ist die Höherentwicklung (Landpflanzen) dann wieder von einer Vereinfachung der Fettsäurebiosynthese und von einer Verarmung an hochungesättigten Fettsäuren begleitet.

5. Bildung der ungesättigten Fettsäuren bei Tieren

Bei einer Übersicht über das Vorkommen von ungesättigten Fettsäuren in der Tierwelt findet man sofort ein ganz charakteristisches Merkmal, nämlich die Unfähigkeit der Tiere, abgesehen von einigen Zooflagellaten, zwei der drei wichtigsten ungesättigten Fettsäuren, die Linol- und die α -Linolensäure, zu synthetisieren. Nur die Palmitolein- und die Ölsäure können noch gebildet werden (191-194). Die Tiere bauen deshalb ihre Fettsäuren entweder aus den beiden zuletzt genannten "Grundfettsäuren" oder aus Linol- und α -Linolensäure auf, die aber exogen mit der Nahrung aufgenommen werden müssen (195-199).

Bei den erwähnten obigen Ausnahmen handelt es sich um die von BLOCH (200) untersuchten Ciliaten Tetrahymena (4 Arten) und Glaucoma chattoni, in denen Bloch u. a. die Öl-, Linol- und die der Linolsäure typengleiche β -Linolensäure fand.

Weiterhin fand KORN (201, 202) in der Bodenamöbe Acanthamoeba und in dem Schleimpilz Physarum polycephalum sowie in den Protomonaden Trypanosoma lewisi und Crithidia sp. (203) die Linolsäure und der Linolsäure typengleiche C_{20} -Fettsäuren. In der Protomonade Leishmania tarentolae fand er auch die α -Linolensäure und in geringen Mengen von dieser sich ableitende C_{20} - und C_{22} -Fettsäuren.

Wie schon erwähnt, müssen die Tiere Linol- und α -Linolensäure exogen aufnehmen und in die entsprechenden längerkettigen und höherungesättigten Fettsäuren umwandeln. Da sie offenbar nicht in der Lage sind, neue Doppelbindungen in Richtung auf das Methyl-Ende der Fettsäuren anzulegen, bleibt also bei den exogen aufgenommenen Fettsäuren der Teil des Fettsäure-Moleküls zwischen der letzten Doppelbindung und dem Methyl-Ende unangetastet. Durch Kettenverlängerung und Anlage neuer Doppelbindungen jeweils auf der Carboxyl-Seite bilden sich deshalb in den Tieren die "Linolsäure"- und die "Linolensäure-Familien" (nach Klenk). Zusammen mit den von den Tieren selbst synthetisierten Fettsäuren Palmitolein- und Ölsäure ergeben sich also vier Grundtypen von ungesättigten Fettsäuren, auf denen sich die zugehörigen vier Fettsäure-Familien aufbauen.

Übergänge zwischen den Fettsäure-Familien bestehen nicht. So ist es den Tieren z. B. nicht möglich, aus Fettsäuren des Ölsäuretyps solche des Linol- oder Linolensäuretyps zu bilden etc. (204 - 207).

a) Palmitoleinsäure-Familie

(Charakteristicum: $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_5-\text{CH}=\text{R}$)

$9-\text{C}_{16}(1=): \text{CH}_3-(\text{CH}_2)_5-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_7-\text{COOH}$ (Palmitoleinsäure)

$6, 9-\text{C}_{16}(2=): \text{CH}_3-(\text{CH}_2)_5-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_4-\text{COOH}$

$11-\text{C}_{18}(1=): \text{CH}_3-(\text{CH}_2)_5-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_9-\text{COOH}$ (cis-Vaccen-S.)

$8, 11-\text{C}_{18}(2=): \text{CH}_3-(\text{CH}_2)_5-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_6-\text{COOH}$

$5, 8, 11-\text{C}_{18}(3=): \text{CH}_3-(\text{CH}_2)_5-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_3-\text{COOH}$

$7, 10, 13-\text{C}_{20}(3=): \text{CH}_3-(\text{CH}_2)_5-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_5-\text{COOH}$

b) Ölsäure-Familie

(Charakteristicum: $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_7-\text{CH}=\text{R}$)

$9-\text{C}_{18}(1=): \text{CH}_3-(\text{CH}_2)_7-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_7-\text{COOH}$ (Öl-Säure)

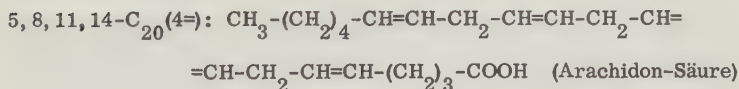
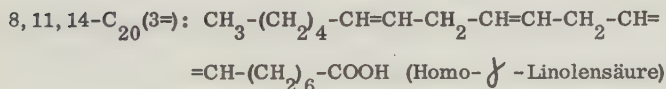
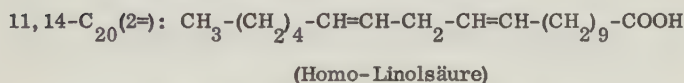
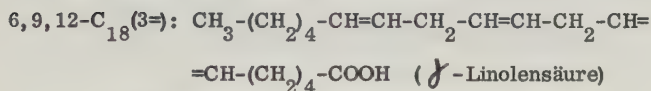
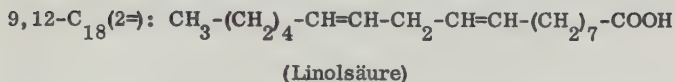
$6, 9-\text{C}_{18}(2=): \text{CH}_3-(\text{CH}_2)_7-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_4-\text{COOH}$

$8, 11-\text{C}_{20}(2=): \text{CH}_3-(\text{CH}_2)_7-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_6-\text{COOH}$

$5, 8, 11-\text{C}_{20}(3=): \text{CH}_3-(\text{CH}_2)_7-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_3-\text{COOH}$

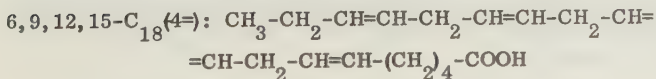
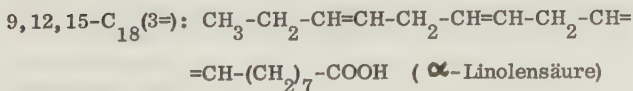
c) Linolsäure-Familie

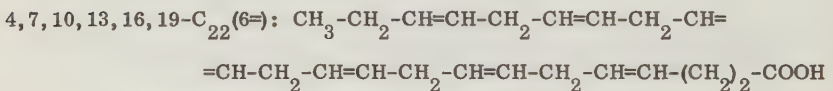
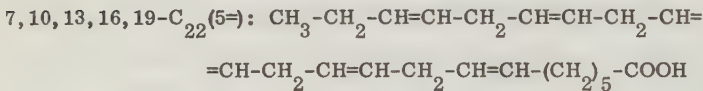
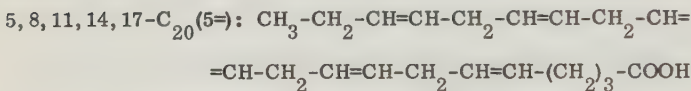
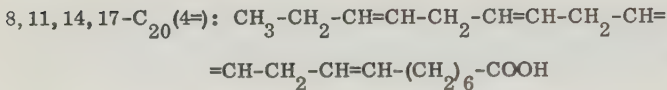
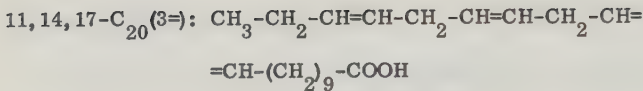
(Charakteristicum: $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}=\text{R}$)



d) α -Linolensäure-Familie

(Charakteristicum: $\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{R}$)





Das Vorkommen und die Bildung dieser ungesättigten Fettsäuren in den Tieren sind vor allem durch die Arbeiten von KLENK (23, 25 - 27, 32, 80, 195, 196, 208 - 211, 213, 214), MEAD (81, 192, 194, 199, 205, 206, 215, 216), BRENNER (217), HOLLOWAY (76), MOHRHAUER (218), RAHM (219) und ACKMAN (220) untersucht worden und in Schema 5 dargestellt.

Wie bereits erwähnt, stellen vor allem die Linolsäure, weniger die α -Linolensäure, essentielle Fettsäuren dar. Der Ausdruck "essentiell" ist insofern für beide gerechtfertigt, als beide Fettsäuren nicht im Tierkörper synthetisiert werden können. Zum Leben notwendig ist jedoch hauptsächlich die Linolsäure. Bei unzureichender Linolsäurezufuhr treten bei den Tieren Mangelercheinungen sowie eine sehr charakteristische Änderung in der Zusammensetzung der ungesättigten Fettsäuren auf: Das Tier verlagert dann offenbar die Bildung der ungesättigten Fettsäuren auf die verbleibenden eigenen Synthesewege, also auf die Bildung der Fettsäuren der Palmitlein- und der Ölsäure-Familien. So beobachtet man z.B. bei Ratten, die ohne Gaben von Linolsäure ernährt wurden, ein starkes Anwachsen der beiden Endprodukte dieser Familien, nämlich der 7, 10, 13-C₂₀(3=) und der 5, 8, 11-C₂₀(3=) Fettsäuren.

C. TRENNUNG VON AUTOTROPHEN UND HETEROTROPHEN

Nach den vorangegangenen Betrachtungen über die Entwicklung der Fettsäure-Synthese in Pflanzen und Tieren ist die Frage nicht zu umgehen, auf welchem "Fettsäure Niveau" eine Trennung der autotrophen (pflanzlichen) Organismen von den heterotrophen, also vorwiegend tierischen Organismen erfolgt sein mag.

Diese Trennung muß, da die Linol- und α -Linolensäure typische Pflanzenfettsäuren sind und die Ölsäure bei Pflanzen und Tieren anzutreffen ist, etwa auf der Fettsäure-Entwicklungslinie Ölsäure - Linolsäure - α -Linolensäure stattgefunden haben.

Für die Art dieser Trennung lassen sich, soweit sie die Bildung der ungesättigten Fettsäuren betrifft, zwei Möglichkeiten diskutieren.

1. Möglichkeit der Trennung auf dem Ölsäure-Niveau

Wertet man die Unfähigkeit der Tiere, Linol- und α -Linolensäure selbst zu synthetisieren, nicht als Verlustmutation, so ist denkbar, daß diese Trennung schon eingetreten ist, bevor die oben genannten ungesättigten Fettsäuren (Linol- und α -Linolensäure) gebildet wurden, also etwa auf dem Ölsäure-Niveau. Die zu den Tieren führenden heterotrophen Formen würden dann, so wie es bei allen nach den Protisten kommenden höheren Tieren der Fall ist, nie die Fähigkeit besessen haben, Linol-, γ - und α -Linolensäure zu bilden. Dann würde die Linol- und α -Linolensäuresynthese der untersuchten Ciliaten, Protomonaden und Amöben eine evolutionäre Neuerwerbung dieser Protozoen darstellen. Die Entwicklung wäre dann so verlaufen, daß die autotrophen Organismen (Pflanzen) aus der Ölsäure vor allem die 9,12-C₁₈(2=) (Linolsäure) bildeten, während die heterotrophen (Tiere) nur die Bildung der 6,9-C₁₈(2=)-Fettsäure (Ölsäure-Typ) vollzogen.

Unter diesen Voraussetzungen wäre es also denkbar, daß die Unfähigkeit zur Linol- und α -Linolensäuresynthese die Entwicklung der Tiere bis zu den heutigen Formen von Anfang an begleitet hat.

Eines der wichtigsten Charakteristica der Tiere ist die Heterotrophie, d.h. die Tiere sind letztlich auf pflanzliche Nahrung (im weiten Sinne) angewiesen. Nach der oben angenommenen Trennung von den Pflanzen wäre deshalb folgende weitere Entwicklung denkbar:

Die Tiere fanden in ihrer Nahrung zunächst die in den Pflanzen gebildete Linolsäure sowie noch später die α -Linolensäure. Sie konnten diese Fett-

säuren wahrscheinlich wesentlich besser für ihren Stoffwechsel gebrauchen als die von ihnen selbst synthetisierten "primitiveren" Öl- und Palmitoleinsäure, oder paßten sich an das Fettsäure-Angebot ihrer Nahrung an. Nach und nach wurde vor allem die Linolsäure für die Tiere unentbehrlich und damit zu einer "essentiellen" Fettsäure, weil besonders bei den höheren Tieren deren Stoffwechselansprüche vermutlich überhaupt nur noch durch diese Fettsäure und ihre Homologen befriedigt werden konnten.

Man hat durch Versuche (156) bewiesen, daß Ratten in der Lage sind, auch ungewöhnliche Fettsäuren wie z. B. verzweigte und ungerade aufzunehmen, einzubauen und zu verlängern. So wäre es auch erklärlich, daß die Tiere die Linol- und α -Linolensäure ebenfalls schnell aufnahmen und dabei noch Vorteile gewannen.

2. Möglichkeit der Trennung auf dem Linol-Linolensäure-Niveau

Nimmt man an, daß die Tiere bei ihrer Evolution die Fähigkeit zur Synthese der Linol- und (γ, α ?)-Linolensäure zuerst besessen und dann wieder verloren haben, so ergibt sich eine andere Art der Abzweigung, nämlich erst auf dem Linol-Linolensäure-Niveau.

Der pflanzliche Zweig würde dann wie unter a) von der Ölsäure über die Linolsäure zur α -Linolensäure und von diesen beiden zu den entsprechenden hochungesättigten C_{20} - und C_{22} -Fettsäuren führen. Der tierische Weg würde nach dem baldigen Verlust der Linol- und α -Linolensäuresynthese durch exogene Aufnahme von Linol- und α -Linolensäure zu den entsprechenden hochungesättigten C_{20} - und C_{22} -Fettsäuren in den Tieren führen.

Eine ähnliche Vermutung äußerte KORN (202). Er postulierte, daß die ersten Protisten ^{x)} fähig waren, Linolsäure und α -Linolensäure zu bilden. Der Weg zu den Pflanzen sei dann unter Verlust des Weges 9, 12- $C_{18}(2=)$ (Linol-S.) -----> 6, 9, 12- $C_{18}(3=)$ bzw. 11, 14- $C_{20}(2=)$ -----> 5, 8, 11, 14- $C_{20}(4=)$ (Arachidon-S.) und der Weg zu den Tieren unter Verlust des Weges 9- $C_{18}(1=)$ (Öl-S.) -----> 9, 12- $C_{18}(2=)$ (Linol-S.) -----> 9, 12, 15- $C_{18}(3=)$ (α -Linolen-S.) vor sich gegangen.

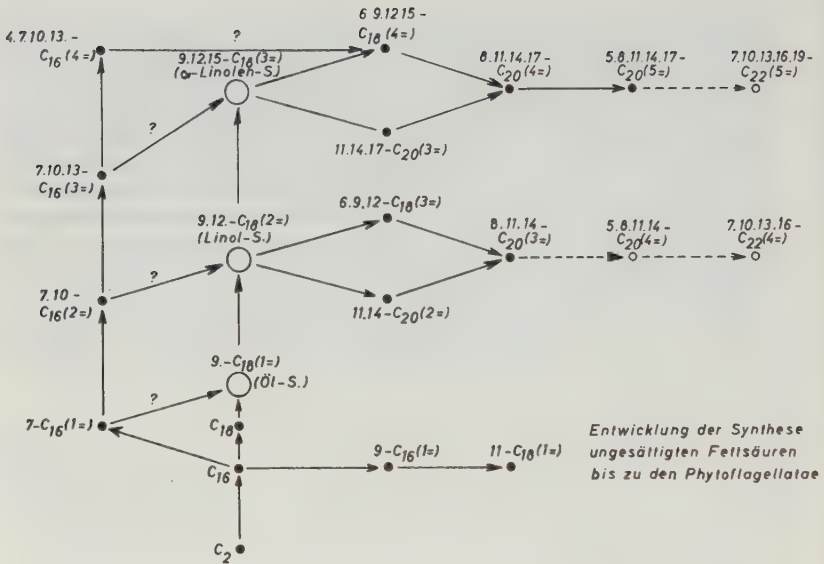
x) Als Protisten bezeichnet man die Gruppe von Einzellern, aus denen sich sowohl die Pflanzen als auch die Tiere entwickelt haben. Nach den heutigen Kenntnissen umfassen die Protisten vor allem die Flagellaten (Phyto- und Zoo-Flagellaten) im weitesten Sinne.

Dieser Hypothese widerspricht aber 1. im Hinblick auf die von Korn vorgeschlagene pflanzliche Entwicklung, daß nach den Untersuchungen von KLENK (28) Meeresalgen die 5, 8, 11, 14-C₂₀(4=)-Fettsäure (Arachidon-S.) enthalten. Außerdem kann die in den Algen ebenfalls vorkommende 8, 11, 14-C₂₀(3=)-Fettsäure nur entweder aus der 6, 9, 12-C₁₈(3=)- oder aus der 11, 14-C₂₀(2=)-Fettsäure gebildet worden sein. Alle obigen drei Fettsäuren sollten nach Korn aber nicht in Pflanzen vorkommen. Es spricht daher mehr dafür, daß während der Entwicklung des Pflanzenreichs zumindest bis zu den Algen kein Syntheseverlust stattgefunden hat. Erst später beim Übergang von den Algen zu den Landpflanzen dürfte dann tatsächlich ein Syntheseverlust eingetreten sein, wie es schon auf S. 102 erwähnt wurde.

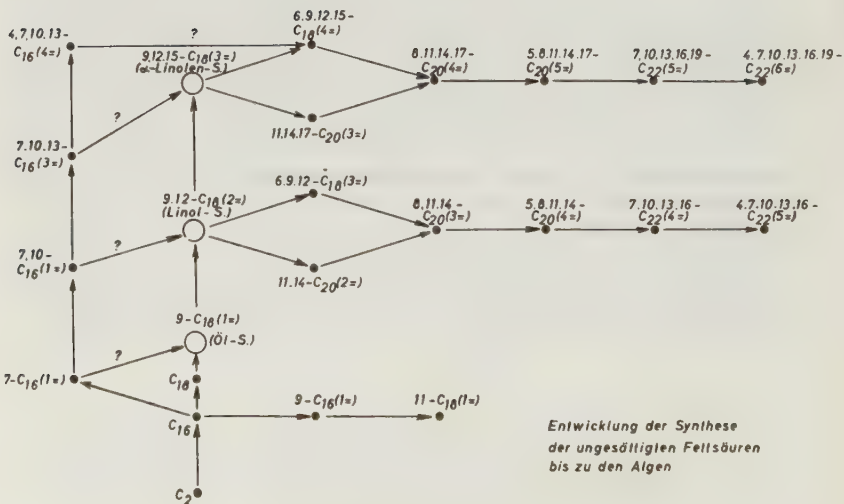
2. erhebt sich im Hinblick auf die tierische Entwicklung die grundsätzliche Frage, ob die zu den heutigen Formen überleitenden niederen Tiere überhaupt die Fähigkeit der Linol- und sogar der α -Linolensäuresynthese besitzen haben. Es besteht nämlich ein gewisser Widerspruch darin, daß zwar einige niedere Tiere (Tetrahymena, Glaucoma, Protomonaden, Amöben) Linol- und eventuell α -Linolensäure synthetisieren können, alle höheren Tiere diese Fähigkeit hingegen nicht besitzen. Bei den Tieren, vor allem bei den Wassertieren, ist kein so krasser Wechsel in den ökologischen Bedingungen aufgetreten, wie es bei den Pflanzen der Übergang vom Wasser zum Land darstellte und der einen Syntheseverlust bei den Tieren u. U. begründen könnte.

Das Vorkommen der Linoltyp-Fettsäuren in den oben erwähnten Ciliaten, Protomonaden und Amöben, und das von α -Linolensäure in Leishmania könnten als Anpassungserscheinungen angesehen werden, weil es sich bei diesen Organismen vielfach um Parasiten handelt, die sich extrem an ihren Wirt angepaßt haben. So ist z. B. interessant, daß man nach den Untersuchungen von KORN (203) nur dann die C₂₀- und C₂₂-Fettsäuren vom Linol- und Linolensäure-Typ in Trypanosoma lewisi findet, wenn die Züchtung in infizierten Ratten erfolgt. Bei Züchtung auf Blut-Agar fehlen diese Fettsäuren dagegen nahezu völlig. Es wäre daher denkbar, daß es sich bei diesen vereinzelt und nur bei den niedersten Tieren auftretenden Fällen um nachträgliche Neuerwerbungen abseits der Hauptentwicklungslinie bzw. um Anpassungen an den Wirt handelt (s. Schema 6, S. 112).

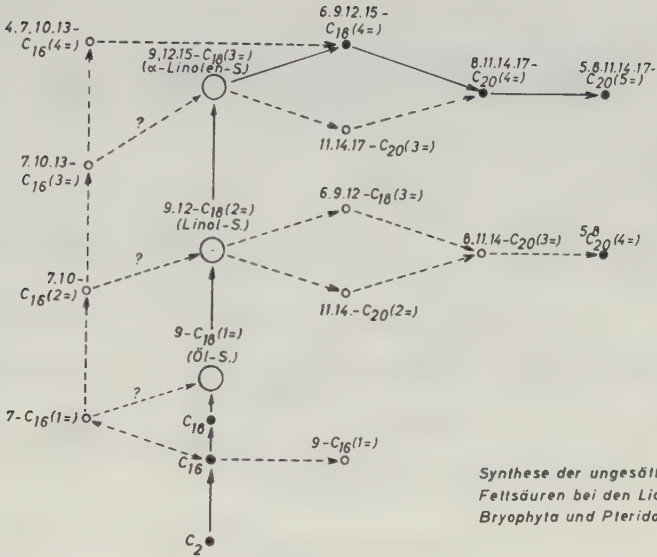
Ob eine der beiden oben genannten Möglichkeiten (1. und 2.) der Trennung von Autotrophen und Heterotrophen den tatsächlichen Verhältnissen entspricht, bleibt dahingestellt.



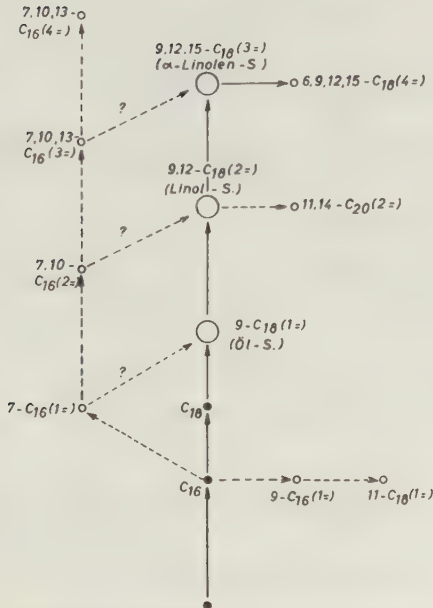
Schema 1

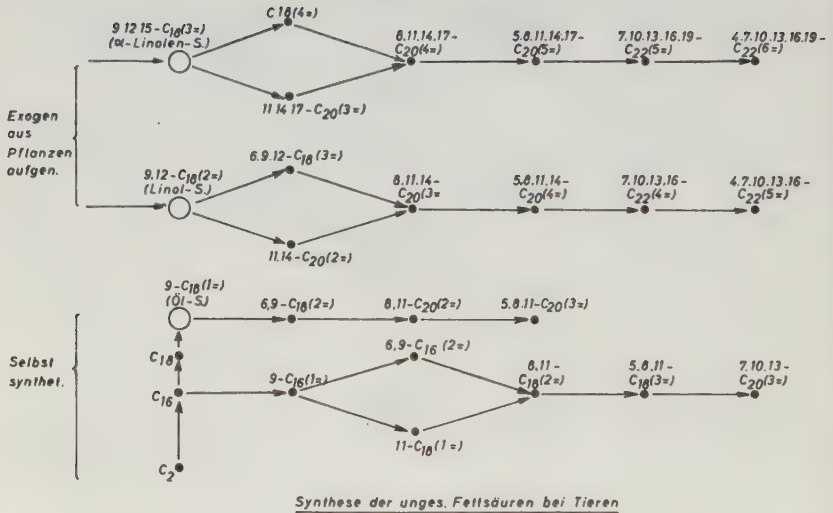


Schema 2

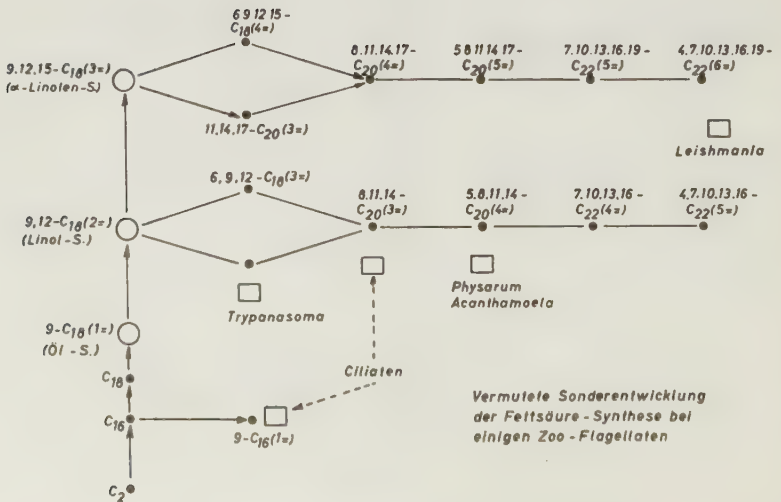


Schema 3





Schema 5



Schema 6

LITERATURVERZEICHNIS

- 1) Spoehr H. u. H. Milner:
Carnegie Inst. Wash. Ybk. 47, 100 (1947 - 1948)
- 2) Milner H. W. :
J. biol. Chemistry 176, 813 (1948)
- 3) Meffert M. E. :
Forschungsber. des Landes Nordrhein-Westfalen
Nr. 8 (1951)
- 4) Paschke R. F. u. D. H. Wheeler:
J. Amer. Oil Chemists' Soc. 31, 81 (1954)
- 5) Fogg G. E. u. D. M. Collyer:
8. Congrès intern. de Botanique, Paris, Sekt. 17,
S. 28 (1954)
- 6) Collyer D. M. u. G. E. Fogg:
J. exp. Botany 6, 256 (1955)
- 7) Meffert M. E. :
Forschungsber. des Landes Nordrhein-Westfalen
Nr. 249 (1956)
- 8) Meffert M. E. :
Forschungsber. des Landes Nordrhein-Westfalen
Nr. 716 (1959)
- 9) Schlenk H., H. K. Mangold, J. L. Gellermann, W. E. Link, R. A. Morissette, R. T. Holman u. H. Hayes:
J. Amer. Oil Chemists' Soc. 37, 547 (1960)
- 10) Williams V. R. u. R. McMillan:
Science 133, 459 (1961)
- 11) Meffert M. E. :
Forschungsber. des Landes Nordrhein-Westfalen
Nr. 952 (1961)
- 12) Krauss R. W. :
Amer. J. Bot. : 49, 425 (1962)
- 13) Harder R. u. A. Oppermann:
Arch. Mikrobiol. 19, 398 (1954)

- 14) Wolters B.: *Planta medica* 12, 85 (1964)
- 15) Hoerr C.W. u. H.J. Harwood:
 J. phys. Chem. 56, 1068 (1952)
- 16) Brown J.B. u. D.K. Kolb:
 Progress in the Chemistry of Fats and other Lipids,
 London, Pergamon Press 1955, Vol. 3, S. 57
- 17) Kolb D.K. u. J.B. Brown:
 J. Amer. Oil Chemists' Soc. 32, 357 (1955)
- 18) Stoffel W. u. E.H. Ahrens:
 J. Amer. chem. Soc. 80, 6604 (1958)
- 19) Schlenk H.: *J. Amer. Oil Chemists' Soc.* 38, 728 (1961)
- 20) Ahrens E.H. u. L.C. Craig:
 J. biol. Chemistry 195, 299 (1952)
- 21) Klenk E. u. F. Lindlar:
 Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 299, 74 (1955)
- 22) Klenk E. u. F. Lindlar:
 Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 301, 156 (1955)
- 23) Klenk E. u. D. Eberhagen:
 Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 307, 42 (1957)
- 24) Klenk E. u. H.J. Tomuschat:
 Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 308, 165 (1957)
- 25) Klenk E. u. H. Bockerhoff:
 Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 310, 153 (1958)
- 26) Klenk E. u. H. Steinbach:
 Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 316, 31 (1959)
- 27) Klenk E. u. L. Brucker-Voigt:
 Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 324, 1 (1961)
- 28) Klenk E., D. Eberhagen u. H. P. Koof:
 Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 334, 44 (1963)
- 29) Scholfield C.R., J. Nowakowska u. H.J. Dutton:
 J. Amer. Oil Chemist's Soc. 37, 27 (1960)

- 30) Will F.: Analytic Chem. 33, 647 (1961)
- 31) Cannon J. A., K. T. Zilch u. H. J. Dutton:
 Analytic Chem. 24, 1530 (1952)
- 32) Klenk E. u. H. Debuch:
 Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 286, 33 (1950)
- 33) Klenk E. W. Bongard:
 Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 291, 104 (1952)
- 34) Klenk E. u. A. Dreike:
 Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 300, 113 (1955)
- 35) Jantzen E. u. R. Hofmann:
 Dissertation Hamburg (1963)
- 36) Schlenk H. u. J. L. Gellermann:
 Analytic Chem. 32, 1412 (1960)
- 37) Toyama Y. u. T. Takagi:
 Fette, Seifen einschl. Anstrichmittel 64 137 (1962)
- 38) Crossley A., T. D. Heyes u. B. J. F. Hudson:
 J. Amer. Oil Chemists' Soc. 39, 9 (1962)
- 39) Privett O. S. u. E. C. Nickell:
 J. Amer. Oil Chemists' Soc. 40, 189 (1963)
- 40) Howard G. A. u. A. J. P. Martin:
 Biochem. J. 46, 532 (1950)
- 41) Crombie W. M. L., R. Comber u. S. G. Boatman:
 Biochem. J. 59, 309 (1955)
- 42) Kapitel W.: Fette, Seifen einschl. Anstrichmittel 58, 91 (1956)
- 43) Hirsch J.: Fed. Proc. 18, 246 (1959)
- 44) Franzke C.: Fette, Seifen einschl. Anstrichmittel 61, 509 (1961)
- 45) Kaufmann H. P.: Fette, Seifen einschl. Anstrichmittel 52, 331 (1950)
- 46) Kaufmann H. P. u. W. H. Nitsch:
 Fette, Seifen einschl. Anstrichmittel 56, 154 (1954)

- 47) Kaufmann H. P. u. W. H. Nitsch:
Fette, Seifen einschl. Anstrichmittel 57, 473 (1955)
- 48) Kaufmann H. P. : Fette, Seifen einschl. Anstrichmittel 58, 492 (1956)
- 49) Kaufmann H. P. u. H. Schnurbusch:
Fette, Seifen einschl. Anstrichmittel 60, 1046 (1958)
- 50) Kaufmann H. P. u. E. Mohr:
Fette, Seifen einschl. Anstrichmittel 60, 165 (1958)
- 51) Kaufmann H. P. u. Z. Makus:
Fette, Seifen einschl. Anstrichmittel 62, 153 (1960)
- 52) Ballance P. E. u. W. M. L. Crombie:
Biochem. J. 69, 632 (1958)
- 53) Mangold H. K., B. G. Lamp u. H. Schlenk:
J. Amer. Chem. Soc. 77, 6070 (1955)
- 54) Mangold H. K., J. L. Gellermann u. H. Schlenk:
Fed. Proc. 17, 268 (1958)
- 55) Seher A. : Fette, Seifen einschl. Anstrichmittel 58, 498 (1956)
- 56) Skipski V. P., S. M. Arfin u. M. M. Rapport:
Arch. Biochem. Biophysics 87, 259 (1960)
- 57) Toyama Y., Y. Iwata u. K. Jujimura:
Fette, Seifen einschl. Anstrichmittel 61, 846 (1959)
- 58) Wagner H., L. Abisch u. K. Bernhard:
Helv. chim. Acta 38, 1536 (1955)
- 59) Wegmann R., P. F. Ceccaldi u. J. Biez:
Fette, Seifen einschl. Anstrichmittel 56, 159 (1954)
- 60) Stahl E. : Pharmazie 11, 633 (1956)
- 61) Stahl E. : Chemiker-Ztg. 82, 323 (1958)
- 62) Kaufmann H. P. u. Z. Makus:
Fette, Seifen einschl. Anstrichmittel 62, 1014 (1960)
- 63) Kaufmann H. P., Z. Makus u. T. H. Khoe:
Fette, Seifen einschl. Anstrichmittel 63, 689 (1961)

- 64) Kaufmann H. P., Z. Makus u. T. H. Khoe:
Fette, Seifen einschl. Anstrichmittel 64, 1 (1962)
- 65) Kaufmann H. P. u. T. H. Khoe:
Fette, Seifen einschl. Anstrichmittel 64, 81 (1962)
- 66) Kaufmann H. P. u. C. V. Viswanathan:
Fette, Seifen einschl. Anstrichmittel 65, 925 (1963)
- 67) Malins D. C. u. H. K. Mangold:
J. Amer. Oil Chemists' Soc. 37, 576 (1960)
- 68) Mangold H. K.: J. Amer. Oil Chemists' Soc. 38, 708 (1961)
- 69) Mangold H. K.: J. Amer. Oil Chemists' Soc. 41, 762 (1964)
- 70) James A. T. u. A. J. P. Martin:
Biochem. J. 50, 679 (1952)
- 71) Cropper F. R. u. A. Heywood:
Nature 172, 1101 (1953)
- 72) Hulanicka D., J. Erwin u. K. Bloch:
J. biol. Chemistry 239, 2778 (1964)
- 73) Magidman P., S. F. Herb, R. A. Barford u. R. W. Riemenschneider:
J. Amer. Oil Chemists' Soc. 39, 137 (1962)
- 74) Davidoff F. u. E. D. Korn:
J. biol. Chemistry 239, 2496 (1964)
- 75) Barron E. J. u. P. K. Stumpf:
J. biol. Chemistry 237, PC613 (1962)
- 76) Holloway P. W. u. S. J. Wakil:
J. biol. Chemistry 239, 2489 (1964)
- 77) Robinson J. D., R. M. Bradley u. R. O. Brady:
J. biol. Chemistry 238, 528 (1963)
- 78) Mohrhauer H. u. R. T. Holman:
J. Lip. Res. 4, 151 (1963)
- 79) James A. T.: Biochim. biophysica Acta 70, 9 (1963)

- 80) Klenk E. u. K.Oette:
Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 318, 86 (1960)
- 81) Howton D.R. u. J.F.Mead:
J.biol.Chemistry 235, 3385 (1960)
- 82) Lennarz W.J., G.Scheuerbrandt u. K.Bloch:
J.biol. Chemistry 237, 664 (1962)
- 83) Lipsky S.R., R.A.Landowne u. L.E.Lovelock:
Analytic. Chem. 31, 852 (1959)
- 84) Camin D.L., R.W.King u. S.D.Shawhan:
Analytic.Chem. 36, 1175 (1964)
- 85) Rosenberg A.: Biochemistry 2, 1148 (1963)
- 86) Orr C.H. u. J.E.Callen:
Ann.N.Y.Acad.Sci. 72, 649 (1959)
- 87) Morris L.J., R.T.Holman u. K.Fontell:
J. Lip.Res. 1, 412 (1960)
- 88) Gerson T., J.E.A.McIntosh u. F.B.Shorland:
Biochem.J. 91, 11c (1964)
- 89) Schlenk H., D.M.Sand u. J.A.Tillotson:
J.Amer.chem. Soc. 77, 3587 (1955)
- 90) Schlenk H., J.A.Tillotson u. B.G.Lamp: ibid.
77, 5437 (1955)
- 91) Abu-Nasr A.M., W.M.Potts u. R.T.Holman:
J.Amer.Oil Chemists' Soc. 31, 16 (1954)
- 92) Leupold F. u. D.Eberhagen:
Fette, Seifen einschl. Anstrichmittel 60, 809 (1958)
- 93) Leupold F. u. D. Eberhagen:
Klin.Wochenschr. 36, 484 (1958)
- 94) Martinez-Moreno J.M.:
Fette, Seifen einschl. Anstrichmittel 54, 550 (1952)
- 95) Newey H.A., E.C.Shokal, A.C.Mueller, T.F.Bradley u. L.C.Fetterly:
Ind.Eng.Chem. 42, 2538 (1950)

- 96) Privett O.S., R. P. Weber u. E. C. Nickell:
J. Amer. Oil Chemists' Soc. 36, 443 (1959)
- 97) Schlenk H. u. R. T. Holman:
J. Amer. chem. Soc. 72, 5001 (1950)
- 98) Sumerwell W.N.: J. Amer. chem. Soc. 79, 3411 (1957)
- 99) Swern D. u. W. E. J. Parker:
J. Amer. Oil Chemists' Soc. 29, 431 (1952)
- 100) Swern D. u. W. E. J. Parker:
J. Amer. Oil Chemists' Soc. 29, 614 (1952)
- 101) Swern D. u. W. E. J. Parker:
J. Amer. Oil Chemists' Soc. 30, 5 (1953)
- 102) Winstein S. u. H. J. Lucas:
J. Amer. chem. Soc. 60, 836 (1938)
- 103) Lucas H. J., R. S. Moore u. D. Pressman:
J. Amer. chem. Soc. 65, 227 (1943)
- 104) Nichols P. L.: J. Amer. chem. Soc. 74, 1091 (1952)
- 105) Dutton H. J., C. R. Scholfield u. E. P. Jones:
Chem. and Ind. 1961, 1874
- 106) de Vries B.: Chem. and Ind. 1962, 1049
- 107) de Vries B. u. G. Jurriens:
Fette, Seifen einschl. Anstrichmittel 65, 725 (1963)
- 108) de Vries B.: J. Amer. Oil Chemists' Soc. 40, 184 (1963)
- 109) Wurster C. F. u. J. H. Copenhaver:
J. Amer. Oil Chemists' soc. 40, 513 (1963)
- 110) Morris L. J.: Chem. and Ind. 1962, 1238
- 111) Scholfield C. R., E. P. Jones, R. O. Butterfield u. H. J. Dutton:
Analytic. Chem. 35, 386 (1963)
- 112) Bhatti M. K. u. B. M. Craig:
J. Amer. Oil Chemists' Soc. 41, 508 (1964)

- 113) Wagner H., J.D.Goetschel u. P.Lesch:
Helv.chim.Acta 46, 2986 (1963)
- 114) Jantzen E. u. H.Andreas:
Chem.Ber. 92, 1427 (1959)
- 115) Stearns E.M., H.B.White u. F.W.Quackenbush:
J.Amer.Oil Chemists' Soc. 39, 61 (1962)
- 116) Jantzen E. u. H.Andreas:
Angew.Chem. 70, 656 (1958)
- 117) Jantzen E. u. H.Andreas:
Chem.Ber. 94, 628 (61)
- 118) Jantzen E., H.Andreas, K.Morgenstern u. W.Roth:
Fette, Seifen einschl. Anstrichmittel 63, 685 (1961)
- 119) Kuemmel D.F.: Analytic.Chem. 34, 1003 (1962)
- 120) White H.B. u. F.W.Quackenbush:
J.Amer.Oil Chemists' Soc. 39, 511 (1962)
- 121) Goldfine H. u. K.Bloch:
J.biol.Chemistry 236, 2596 (1961)
- 122) Kishimoto Y. u. N.S.Radin:
J. Lip. Res. 1, 72 (1959)
- 123) Inouye Y., M.Noda u. O.Hirayama:
J.Amer.Oil Chemists' Soc. 32, 132 (1955)
- 124) Inouye Y. u. M.Noda:
Arch. Biochem. Biophysics 76, 271 (1958)
- 125) Inouye Y. u. M.Noda:
J. Agr. Chem. Soc. Japan 33, 452 (1959)
- 126) Mangold H.K. u. R.Kammereck:
Chem. and Ind. 1961, 1032
- 127) Klenk E. u. D.Eberhagen:
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 328, 189 (1962)
- 128) Klenk E. u. W.Knipprath:
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 317, 243 (1959)

- 129) Klenk E. u. W. Knipprath:
Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem. 327, 283 (1962)
- 130) Holman R. T. u. H. Hayes:
Analytic. Chem. 30, 1422 (1958)
- 131) Rehm K. :
Dissertation in Vorbereitung, München
- 132) Wagner H. u. P. Pohl:
Biochem. Z. 340, 337 (1964)
- 133) Montag W., K. Klenk, H. Hayes u. R. T. Holman:
J. biolog. Chemistry 227, 53 (1957)
- 134) Lowry O. H., N. R. Roberts, K. Y. Leiner, Mei-Ling Wu u. A. L. Farr:
J. biol. Chemistry 207, 1 (1954)
- 135) Hilditch T. P. :
The chemical constitution of natural fats, 3. ed.,
1956, N. Y. (J. Wiley)
- 136) Lynen F. :
Nature 174, 962 (1954)
- 137) Lynen F. :
J. cellular comparat. Physiol. 54, suppl. 1, 33 (1959)
- 138) Lynen F., J. Knappe, E. Lorch, G. Jütting u. E. Ringelmann:
Angew. Chem. 71, 481 (1959)
- 139) Lynen F. :
Bayer. Akad. d. Wiss., Sitzungsbericht v. 4. 3. 60.
- 140) Lynen F., J. Knappe, E. Lorch, G. Jütting, E. Ringelmann u. J. P.
Lachange:
Biochem. Z. 335, 123 (1961)
- 141) Lynen F. :
Fed. Proc. 20, 941 (1961)
- 142) Lynen F., G. F. Domagk, M. Goldmann u. I. Kessel:
Biochem. Z. 335, 519 (1962)
- 143) Lynen F., I. Hopper-Kessel u. H. Eggerer:
Biochem. Z. 340, 95 (1964)
- 144) Numa S., E. Ringelmann u. F. Lynen:
Biochem. Z. 340, 228 (1964)
- 145) Gibson D. M., E. B. Titchener u. S. J. Wakil:
Biochim. biophysica Acta 30, 376 (1958)

- 146) Gibson D.M., E.D. Titchener u. S.J. Wakil:
J. Amer. chem. Soc. 80, 2908 (1958)
- 147) Wakil S.J., E.B. Titchener u. D.M. Gibson:
Biochim. biophysica Acta 29, 225 (1958)
- 148) Wakil S.J. :
J. Amer. chem. Soc. 80, 6465 (1958)
- 149) Wakil S.J. u. D.M. Gibson:
Biochim. biophysica Acta 41, 122 (1960)
- 150) Bressler R. u. S.J. Wakil:
J. biol. Chemistry 236, 1643 (1961)
- 151) Waite M. u. S.J. Wakil:
J. biol. Chemistry 237, 2750 (1962)
- 152) Goldman P., A.W. Alberts u. P.R. Vagelos:
J. biol. Chemistry 238, 1255 (1963)
- 153) Stallberg-Stenhagen S. :
Arkiv Kemi Mineral. Geol. 26A, 7 (1948)
- 154) Prout F.S., J. Cason u. A.W. Ingersoll:
J. Amer. chem. Soc. 70, 298 (1948)
- 155) Jaureguiberry G., J.H. Law, J.A. McCloskey u. E. Lederer:
C.R. hebd. Séances Acad. Sci. 258, 3587 (1964)
- 156) Horning M.G., D.B. Martin, A. Kamen u. P.R. Vagelos:
J. biol. Chemistry 236, 669 (1961)
- 157) Martin D.B., M.G. Horning u. P.R. Vagelos:
J. biol. Chemistry 235, 3093 (1960)
- 158) Goldman P., A.W. Alberts u. P.R. Vagelos:
J. biol. Chemistry 238, 3579 (1963)
- 159) Bloomfield D.K. u. K. Bloch:
Biochim. biophysica Acta 30, 220 (1958)
- 160) Lennarz W.J. u. K. Bloch:
J. biol. Chemistry 235, PC26 (1960)
- 161) Bloch K., P. Baronowsky, H. Goldfine, W.J. Lennarz, R. Light,
A.T. Norris u. G. Scheuerbrandt:
Fed. Proc. 20, 921 (1961)

- 162) Lennarz W.J., R.J. Light u. K. Bloch:
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48, 840 (1962)
- 163) Fulco A.J. u. K. Bloch:
J. biol. Chemistry 239, 993 (1964)
- 164) Stumpf P.K. u. A.T. James:
Biochim. biophysica Acta 70, 20 (1963)
- 165) Giovanelli J. u. P.K. Stumpf:
J. biol. Chemistry 231, 411 (1958)
- 166) Stumpf P.K. :
Nature 194, 1158 (1962)
- 167) Scheuerbrandt G., H. Goldfine, P.E. Baronowsky u. K. Bloch:
J. biol. Chemistry 236, PC 70 (1961)
- 168) Scheuerbrandt G. u. K. Bloch:
J. biol. Chemistry 237, 2064 (1962)
- 169) Yuan C. u. K. Bloch:
J. biol. Chemistry 236, 1277 (1961)
- 170) Hofmann K. u. F. Tausig:
J. biol. Chemistry 213, 425 (1955)
- 171) Kaneshiro T. u. A.G. Marr:
J. biol. Chemistry 236, 2615 (1961)
- 172) Hofmann K., R.A. Lucas u. S.M. Sax:
J. biol. Chemistry 195, 473 (1952)
- 173) Hofmann K., W.M. O' Leary, C.W. Yoho u. T.Y. Liu:
J. biol. Chemistry 234, 1672 (1959)
- 174) Harris R.V., B.J.B. Wood u. A.T. James:
Biochem. J. 94, 22P (1965)
- 175) Hofmann K. u. F. Tausig:
J. biol. Chemistry 213, 415 (1955)
- 176) Hofheinz W. u. H. Grisebach:
Z. Naturforsch. 20b, 43 (1965)
- 177) Fulco A.J., R. Levy u. K. Bloch:
J. biol. Chemistry 239, 998 (1964)
- 178) Norris A.T. u. K. Bloch:
J. biol. Chemistry 238, PC 3133 (1963)

- 179) Meyer F. u. K. Bloch:
J. biol. Chemistry 238, 2654 (1963)
- 180) Meyer F. u. K. Bloch:
Biochim. biophysica Acta 77, 671 (1963)
- 181) Andreassen A. A. u. T. J. B. Stier:
J. cellular comparat. Physiol. 43, 271 (1954)
- 182) Bloomfield D. K. u. K. Bloch:
J. biol. Chemistry 235, 337 (1960)
- 183) Erwin J. u. K. Bloch:
Biochem. Z. 338, 496 (1963)
- 184) Korn E. D.:
J. Lip. Res. 5, 352 (1964)
- 185) Haines T. H., S. Aaronsson, J. L. Gellermann u. H. Schlenk:
Nature 194, 1282 (1962)
- 186) Fott B.:
Algenkunde, G. Fischer-Verlag, Jena 1959
- 187) Wagner H. u. H. Friedrich:
Biochem. Z., im Druck
- 188) Wagner H. u. H. König:
Biochem. Z. 339, 212 (1963)
- 189) Wagner H. u. H. Friedrich:
Naturwiss. 51, 164 (1964)
- 190) Kleiman R., F. R. Earle u. J. A. Wolff:
J. Amer. Oil Chemists' Soc. 41, 459 (1964)
- 191) Klein P. D. u. R. M. Johnson:
Arch. Biochem. Biophysics 48, 380 (1954)
- 192) Mead J. F.:
J. biol. Chemistry 227, 1025 (1957)
- 193) Fulco A. J.:
J. biol. Chemistry 234, 1411 (1959)
- 194) Mead J. F., M. Kayama u. R. Reiser:
J. Amer. Oil Chemists' Soc. 37, 438 (1960)
- 195) Klenk E.:
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 302, 268 (1955)
- 196) Klenk E. u. G. Kremer:
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 320, 111 (1960)

- 197) Leupold F. u. G. Kremer:
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 318, 251 (1960)
- 198) Steinberg G., W. H. Slaton, D. R. Howton u. J. F. Mead:
J. biol. Chemistry 220, 257 (1956)
- 199) Mead J. F., G. Steinberg u. D. R. Howton:
J. biol. Chemistry 205, 683 (1953)
- 200) Erwin J. u. K. Bloch:
J. biol. Chemistry 238, 1618 (1963)
- 201) Korn E. D.: J. biol. Chemistry 238, 3584 (1963)
- 202) Korn E. D.: J. biol. Chemistry 239, 396 (1964)
- 203) Korn E. D., C. L. Grennblatt u. A. M. Lees:
L. Lip. Res. 6, 43 (1965)
- 204) Widmer C. u. R. T. Holman:
Biochim. biophysica Acta 25, 1 (1950)
- 205) Mead J. F., W. H. Slaton u. A. B. Decker:
J. biol. Chemistry 218, 401 (1956)
- 206) Steinberg G., W. H. Slaton, D. R. Howton u. J. F. Mead:
J. biol. Chemistry 224, 841 (1957)
- 207) Stoffel W.: Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 333, 71 (1963)
- 208) Klenk E. u. W. Bongard:
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 292, 51 (1953)
- 209) Klenk E. u. H. Brockerhoff:
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 307, 272 (1957)
- 210) Klenk E. u. H. Mohrhauer:
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 320, 218 (1960)
- 211) Klenk E. u. D. Eberhagen:
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 328, 180 (1962)
- 212) Harder; aus: Strasburger E., F. Noll, H. Schenk u. A. F.
Schimper: Lehrbuch der Botanik, G. Fischer-Verlag, Stuttgart,
1958 (S. 613)
- 213) Klenk E. u. G. Tschöpe:
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 334, 193 (1963)

- 214) Klenk E. u. H. Pflüger: *ibid.*
335, 53 (1963)
- 215) Mead J. F. u. D. R. Howton:
J. biol. Chemistry 229, 575 (1957)
- 216) Mead J. F.: *Fed. Proc.* 20, 952 (1961)
- 217) Brenner R. R., D. V. Vazza u. M. E. de Tomas:
J. Lip. Res. 4, 341 (1963)
- 218) Mohrhauer H. u. R. T. Holman:
J. Lip. Res. 4, 346 (1963)
- 219) Rahm J. S. u. R. T. Holman:
J. Lip. Res. 5, 169 (1964)
- 220) Ackman R. G.: *J. Fisheries Res. Board Canada* 21, 247 (1964)
- 221) Brady R. O., R. M. Bradley u. E. G. Trams:
J. biol. Chem. 235, 3093 (1960)
- 222) Privett O. S., E. Breault, J. B. Covell, L. N. Norcia u. W. O. Lundberg:
J. Amer. Oil Chemist's Soc. 35, 366 (1958)
- 223) Privett O. S., M. L. Blank u. O. Romanus:
J. Lip. Res. 4, 260 (1963)

Lebenslauf

Am 8.1.1935 wurde ich, Peter Pohl, als ältester Sohn des Dipl.-Ing. Rudolf Pohl und seiner Ehefrau Ingeborg, geb. Raettig, in Kassel geboren.

Nach Aufhalten in Halle/Sachsen und Molsdorf/Thüringen zog unsere Familie 1938 nach Linz/Österreich. Hier besuchte ich von 1941 bis 1945 die Volksschule. Kurz nach Kriegsende wurden wir als Deutsche ausgewiesen und kamen nach Bramsche/Niedersachsen, wo ich von 1946 bis 1950 die Mittelschule besuchte. Anschließend war ich Schüler an der damaligen Oberschule für Jungen in Osnabrück, dem heutigen Ernst Moritz Arndt-Gymnasium, wo ich 1955 die Reifeprüfung ablegte.

Meine zweijährige Praktikantenzeit in der Stern-Apotheke zu Osnabrück beschloss ich mit der Pharmazeutischen Vorprüfung in Osnabrück im März 1957. Vom Wintersemester 1957 bis Sommersemester 1960 studierte ich an der Universität Tübingen Pharmazie und bestand dort im Oktober 1960 das Pharmazeutische Staatsexamen. Danach war ich 8 Monate in der Tonhallen-Apotheke in Düsseldorf und 4 Monate in der Rennweg-Apotheke in Zürich tätig. Meine Bestallung als Apotheker erhielt ich im Februar 1962.

Von November 1961 bis Juni 1965 arbeitete ich mit einer halbjährigen Unterbrechung, die ich 1964 als Stipendiat der Stiftung Volkswagenwerk zu Forschungszwecken an der Zoologischen Station von Neapel verbrachte, am Institut für Pharmazeutische Arzneimittel-Lehre der Universität München, wo ich unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. H. Wagner die vorliegende Arbeit durchführte.

